

**Parametrische Untersuchung des Einflusses verschiedener
Kultivierungsbedingungen auf die Barriereigenschaften
von hCMEC/D3 Zellen unter Verwendung eines
dynamischen Zellkulturmodells**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Sarah Hinkel

aus Berlin

1. Referentin: Professorin Dr. Christel Müller-Goymann

2. Referent: apl. Professor Dr. Stephan Reichl

eingereicht am: 03.02.2020

mündliche Prüfung (Disputation) am: 16.04.2020

Druckjahr 2020

Vorveröffentlichungen

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden mit Erlaubnis der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikation

Hinkel, S.; Mattern K.; Dietzel A.; Reichl, S.; Müller-Goymann, C. C. (2018): Parametric investigation of static and dynamic cell culture conditions and their impact on hCMEC/D3 barrier properties. In *International Journal of Pharmaceutics* (566), pp. 434-444.

Tagungsbeiträge

Hinkel, S.; Reichl, S.; Müller-Goymann, C. C. (2015): Influence of cell culture media on the growth behavior and barrier properties of hCMEC/D3 cells (Poster), 1st Symposium on Pharmaceutical Engineering Research (SPhERe), Braunschweig

Hinkel, S.; Mattern K.; Dietzel A.; Reichl, S.; Müller-Goymann, C. C. (2017): Optimization and evaluation of the *Cerebral* Dynamic Micro Tissue Engineering System (*Cerebral* DynaMiTES) (Poster), 2nd PVZ Research Workshop, St. Andreasberg

Hinkel, S.; Mattern K.; Dietzel A.; Reichl, S.; Müller-Goymann, C. C. (2017): Evaluation of a novel Dynamic Micro Tissue Engineering System as blood-brain barrier model: *Cerebral* DynaMiTES (Poster), 19th Barrier- and Transporter-Meeting, Bad Herrenalb

Hinkel, S.; Mattern K.; Dietzel A.; Reichl, S.; Müller-Goymann, C. C. (2017): Evaluation of a novel cell culture platform for dynamic cultivation of barrier-forming cells (Poster), 2nd Symposium on Pharmaceutical Engineering Research (SPhERe), Braunschweig

Hinkel, S.; Mattern K.; Dietzel A.; Reichl, S.; Müller-Goymann, C. C. (2018): Evaluation of the novel *Cerebral* DynaMiTES for dynamic cultivation of different barrier-forming cells (Poster), 11th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Granada

Hinkel, S.; Mattern K.; Dietzel A.; Reichl, S.; Müller-Goymann, C. C. (2018): Evaluation of a novel cell culture platform with various barrier forming cells for dynamic cultivation (Poster), DECHEMA 3D Cell Culture conference, Freiburg

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand unter Anleitung von Frau Prof. Dr. C. C. Müller-Goymann am Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig.

Frau Prof. Dr. Christel C. Müller-Goymann

danke ich herzlich für die Bereitstellung des Themas, die Unterstützung bei dessen Bearbeitung sowie für die ständige Diskussionsbereitschaft und das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Herrn Prof. Dr. Stephan Reichl vom Institut für Pharmazeutische Technologie danke ich für die enge Zusammenarbeit, die umfassende fachliche Unterstützung sowie für die Anfertigung des Zweitgutachtens.

Ich danke dem Niedersächsischen Ministerium für Wissenschaft und Kultur für die Förderung des Promotionsprogramms „ μ -Props - Processing of poorly soluble drugs at small scale“.

Herrn Prof. Dr. Andreas Dietzel vom Institut für Mikrotechnik und seinen Mitarbeitern Dipl.-Ing. Kai Mattern und Michael Wiegandt danke ich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des μ -Props-Projekts und die Anfertigung der Mikrosysteme. Zudem danke ich Dipl.-Ing. Eugen Koch für die stete Bereitschaft zur Diskussion aus ingenieurswissenschaftlicher Sicht. Ebenso danke ich allen Kolleginnen und Kollegen des Promotionsprogramms für die schöne Zeit in der Forschungsgruppe, die interessanten Forschungsseminare und die gemeinsamen Exkursionen.

Ich bedanke mich bei allen wissenschaftlichen und technischen Mitarbeitern des Institutes für die besonders angenehme Arbeitsatmosphäre und die kollegiale Zusammenarbeit. Ganz besonderer Dank gilt meinen Kollegen aus dem Zellkulturlabor für die fachlichen Diskussionen und die gegenseitige Unterstützung, u. a. bei den Fütterungsdiensten an den Feiertagen. Anne Dolberg danke ich herzlich für die Einweisung ins Zellkulturlabor und Dagmar Hahne für die Einarbeitung in die Kultivierung von Säugetierzellen. Dr. Nicole Beißner danke ich für die vielen

Hilfestellungen hinsichtlich des mikrofluidischen Systems DynaMiTES, den fachlichen Rat und die mentale Unterstützung. Ebenso bedanke ich mich bei ihr für die Einführung der histochemischen Färbungen sowie bei Lucia Albrecht für die Anfertigung der Probenschnitte. Bei Verena Ledwig bedanke ich mich recht herzlich für die Einarbeitung in die Immunfluoreszenzfärbungen sowie den regen Erfahrungsaustausch und die gegenseitige Unterstützung. In besonderer Erinnerung bleiben mir auch die vielen gemeinsamen Forschungspraktika mit Mandy Schulze.

Weiterhin danke ich Frau Blecharz-Lang von der Charité Berlin für die Überlassung der murinen zerebralen Endothelzelllinie und Prof. Eugene Major vom *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NINDS, US-Bethesda) für die Bereitstellung der humanen Astrozytenzelllinie.

Regina Draheim, Elena Kurzbach und Carsten Riewe danke ich für das aufmerksame Korrekturlesen dieser Arbeit und die vielen konstruktiven Anmerkungen.

Vielen lieben Dank auch an meinen Partner und meine Familie, da sie immer für mich da waren und mir mit ihrer Unterstützung die notwendige Durchhaltekraft verliehen haben!

Abkürzungsverzeichnis

ACTB	Gen, welches das Protein β -Actin kodiert
AE	Anheftungseffizienz
AJ	<i>Adherens Junction</i>
AK	Antikörper
AKM	Astrozyten-konditioniertes Medium
AM	Assaymedium
ARPE19	<i>Adult retinal pigment epithelial cell line-19</i>
BBB	<i>Blood-brain barrier</i>
BCEC	<i>Brain capillary endothelial cells</i>
BCRP	<i>Breast cancer resistance protein</i>
bEND.3/5	<i>Brain endothelial (mouse cells)</i>
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i>
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	<i>Base pair</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
Caco-2	<i>Human colonic adenocarcinoma-2 cells</i>
Calcein AM	Acetomethoxyderivat von Calcein
CDH5	Gen, welches das Protein VE-Cadherin kodiert
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
cEND	<i>(Cerebral) capillary endothelial cells</i>
CLDN5	Gen, welches das Protein Claudin-5 kodiert
CO ₂ -IDM	<i>CO₂-independent medium</i>
CR	<i>Chloroprene rubber</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
DynaMiTES	<i>Dynamic Micro Tissue Engineering System</i>
ECACC	<i>European Collection of Authenticated Cell Cultures</i>
ECGM	<i>Endothelial cell growth medium</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EPDM	Ethylen-Propylen-Dien-Monomer
ESCs	<i>Embryonal stem cells</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
FD4	Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-Dextran 4 kDa
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Gen, welches das Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase kodiert
GDNF	<i>Glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GK	Glukokortikoide
HBMEC	<i>Human brain microvascular endothelial cells</i>
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HCK	<i>Human corneal keratinocytes</i>
HCMC	<i>Human capillary and microvascular endothelial cells</i>
hCMEC/D3	<i>Human cerebral microvascular endothelial cell line / D3</i>
HE	Hämatoxylin und Eosin
HEMA	Hydroxyethylmethacrylat
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
hESFM	<i>Human endothelial serum-free medium</i>
HMVEC	<i>Human mammary vascular endothelial cells</i>
HPT-Zellen	Humane proximale Tubuluszellen
hTERT	Humane Telomerase-Reverse-Transkriptase
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>
(i)	Invers eingesät
ID	Innendurchmesser
IFN γ	Interferon- γ
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IKM	Immobilisierte künstliche Membran
iPSCs	<i>Induced pluripotent stem cells</i>
JAM	Junktionales Adhäsionsmolekül
KRB	<i>Krebs-Ringer buffer</i>
MBEC	<i>Mouse brain endothelial cells</i>

MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney cells</i>
MDR	<i>Multidrug-resistance</i>
MEM	<i>Minimal essential medium</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MRP	<i>Multidrug resistance-related protein</i>
MTT	Methylthiazolyldiphenyltetrazoliumbromid
MUPP-1	<i>Multi-PDZ-domain protein-1</i>
(n)	Normal eingesät
NaF	Natriumfluoreszein
NBR	<i>Nitrile butadiene rubber</i>
NEAA	<i>Non-essential amino acids</i>
NGS	<i>Normal goat serum</i>
NRQ	<i>Normalized relative quantity</i>
NVU	<i>Neurovascular unit</i>
OLCN	Gen, welches das Protein Occludin kodiert
OOC	<i>Organ-on-chip</i>
PAMPA	<i>Parallel artificial membrane permeation assay</i>
PBEC	<i>Porcine brain endothelial cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PC	Polycarbonat
pCPT-cAMP	<i>8-(4-chlorophenylthio)adenosine 3',5'-cyclic monophosphate sodium salt</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDMS	Polydimethylsiloxan
PDT	<i>Population doubling time</i>
PDZ-Domäne	Anfangsbuchstaben der ersten Proteine, bei denen die PDZ-Domäne detektiert wurde: das synaptische Protein PSD95/SAP90 , das <i>Septate Junction</i> -Protein Discs large aus <i>Drosophila melanogaster</i> und das <i>Tight Junction</i> -Protein ZO-1
PECAM-1	<i>Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PET	Polyethylenterephthalat
PFA	Paraformaldehyd

P-gp	P-Glykoprotein
PI	Propidiumiodid
PMMA	Polymethylmethacrylat
PSCs	<i>Pluripotent stem cells</i>
PTFE	Polytetrafluorethylen
PymT	Mittleres T-Onkogen eines murinen Polyomavirus
qRT-PCR	<i>Quantitative Real-Time-PCR</i>
RBE4	<i>Rat brain endothelial cell line 4</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
Ro-20-1724	4-(3-Butoxy-4-methoxybenzyl)-2-imidazolidinone, 4-(3-Butoxy-4-methoxybenzyl)-2-imidazolidinone
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT	Reverse Transkriptase
SF ECM	<i>Serum-free endothelial cell medium</i>
SLC	<i>Solute carrier</i>
SV	Simian-Virus
TAMP	<i>TJ associated MARVEL proteins</i>
TBS-T	Tris-buffered saline mit Tween 20
TEER	<i>Transendothelial electrical resistance</i>
Temp.	Temperatur
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TJ	<i>Tight Junction</i>
TJP1	Gen, welches das Protein <i>Tight Junction</i> Protein 1 (ZO-1) kodiert
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
VE-Cadherin	Vaskuläres endotheliales Cadherin
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
vWF	von-Willebrand-Faktor
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO	<i>Zonula occludens</i>

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2	THEORETISCHER HINTERGRUND	3
2.1	Die Blut-Hirn-Schranke.....	3
2.1.1	Anatomie der Blut-Hirn-Schranke.....	5
2.1.1.1	Zerebrale Endothelzellen	5
2.1.1.2	Perizyten	10
2.1.1.3	Astrozyten	10
2.1.1.4	Die Basalmembran.....	11
2.1.2	Transportprozesse der Blut-Hirn-Schranke	12
2.2	Schädigung der Blut-Hirn-Schranke.....	13
2.3	Modelle der Blut-Hirn-Schranke	15
2.3.1	Statische <i>in vitro</i> -Modelle der Blut-Hirn-Schranke	16
2.3.2	Dynamische <i>in vitro</i> -Modelle der Blut-Hirn-Schranke.....	18
2.3.3	Zellkultivierung zerebraler Kapillarendothelzellen	22
3	MATERIAL UND METHODEN	27
3.1	Material.....	27
3.1.1	Antikörper	27
3.1.2	Primer und Templates.....	27
3.1.3	Substanzen	28
3.1.4	Kits.....	30
3.1.5	Verbrauchsmaterialien	30
3.1.6	Laborgeräte und Software	31
3.1.7	Dynamisches Zellkulturmodell.....	33
3.1.7.1	Entwicklungsverlauf der DynaMiTES-Prototypen	35
3.1.7.2	DynaMiTES-Materialien.....	36

3.2 Methoden	37
3.2.1 Allgemeine Zellkultivierungsmethoden.....	37
3.2.1.1 Kultivierung und Subkultivierung.....	37
3.2.1.2 Kryokonservierung.....	38
3.2.1.3 Immortalisierte humane zerebrale Endothelzelllinie hCMEC/D3	39
3.2.1.4 Immortalisierte murine zerebrale Endothelzelllinie cEND.....	41
3.2.1.5 Immortalisierte canine renale Epithelzelllinie MDCK.....	41
3.2.1.6 Immortalisierte humane Astrozytenzelllinie SVGmm.....	42
3.2.2 Proliferationsverhalten von hCMEC/D3	43
3.2.3 Untersuchung der Anheftungseffizienz.....	44
3.2.4 Untersuchung der Angiogenese.....	44
3.2.5 Immunfluoreszenzfärbung	45
3.2.6 Genexpressionsanalyse.....	46
3.2.6.1 RNA-Isolierung	46
3.2.6.2 cDNA-Synthese	47
3.2.6.3 Quantitative <i>Real-Time</i> Polymerase-Kettenreaktion	48
3.2.7 Zellkultivierung im Transwell™- bzw. ThinCert™-Modell	50
3.2.7.1 Aufbau einer Mono- und Ko-Kultur mit hCMEC/D3	50
3.2.7.2 Variationen von Kultivierungsbedingungen	51
3.2.7.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	52
3.2.7.4 Transendothelialer elektrischer Widerstand.....	54
3.2.7.5 Statische Permeationsuntersuchungen.....	54
3.2.7.6 Materialtestung	56
3.2.8 Zellkultivierung im <i>Cerebral</i> DynaMiTES	57
3.2.8.1 Vorkultivierung einer Mono- und Ko-Kultur mit hCMEC/D3	57
3.2.8.2 Statische und dynamische Kultivierung im DynaMiTES	58
3.2.8.3 Direkte Zelleinsaat ins DynaMiTES	60
3.2.8.4 Kultivierungsbedingungen weiterer Zelllinien	61
3.2.8.5 Untersuchung der Zellviabilität.....	62
3.2.8.6 TEER-Untersuchung im DynaMiTES.....	63
3.2.8.7 Statische und dynamische Permeationsuntersuchungen.....	64
3.2.8.8 Untersuchung von pH und Temperatur	65
3.2.9 Statistik.....	65

4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	66
4.1	Charakterisierung der zerebralen humanen Endothelzelllinie unter Anwendung eines statischen Mono-Kulturmodells.....	66
4.1.1	Mikroskopische Untersuchung der Zellmorphologie und Zellkonfluenz.....	66
4.1.2	Funktionalität der hCMEC/D3 Zelllinie.....	67
4.1.3	Lokalisationsanalyse der TJ-Proteine	69
4.1.4	Zusammenfassende Diskussion zur Charakterisierung der zerebralen Endothelzelllinie hCMEC/D3	70
4.2	Untersuchung diverser statischer Kultivierungsvariationen der humanen Endothelzelllinie hCMEC/D3	72
4.2.1	Einfluss von Zellkulturmedien auf die Wachstums- und Barriereigenschaften 72	
4.2.1.1	Quantitative Untersuchung der Genexpression von TJ-Proteinen in Abhängigkeit von den Kultivierungsmedien.....	75
4.2.2	Einfluss weiterer Kultivierungsbedingungen auf die Barriereigenschaften.....	76
4.2.2.1	Permeationsuntersuchungen in einem Mono- und Ko-Kulturmodell der Blut-Hirn-Schranke.....	79
4.2.3	Zusammenfassende Diskussion zur Untersuchung diverser Kultivierungsvariationen der humanen Endothelzelllinie.....	82
4.3	Weiterentwicklung des dynamischen Zellkulturmodells zum <i>Cerebral DynaMiTES</i>.....	85
4.3.1	Elektrodenvergleich mit herkömmlichen Elektroden	87
4.3.2	Anpassung an das DynaMiTES.....	88
4.3.2.1	Einfluss der Zellorientierung auf die Endothelzellen	88
4.3.2.2	Verwendung eines CO ₂ -unabhängigen Mediums	89
4.3.3	Zusammenfassende Diskussion zur Weiterentwicklung des dynamischen Zellkulturmodells zum <i>Cerebral DynaMiTES</i>	91
4.4	Kultivierung von hCMEC/D3 Zellen im <i>Cerebral DynaMiTES</i>.....	94
4.4.1	Untersuchung verschiedener Ausgangskonfluenzen	94
4.4.2	Zellkultivierung über 3 h und 24 h.....	95
4.4.2.1	Einfluss auf die Zellviabilität und die Zellkonfluenz	95
4.4.2.2	Einfluss auf die Barriereigenschaften.....	98
4.4.3	Zellkultivierung über einen Zeitraum von ≥ 72 h	99
4.4.3.1	Kontaminationen im DynaMiTES.....	99

4.4.3.2	pH-Veränderungen im DynaMiTES	102
4.4.3.3	Undichtigkeiten des DynaMiTES	104
4.4.3.4	Einfluss auf die Zellkonfluenz und die Zellviabilität	105
4.4.3.5	Einfluss auf die Zellumgebung und die Barriereintegrität	107
4.4.3.6	Dynamische Ko-Kultivierung im DynaMiTES	108
4.4.3.7	Zellkultivierung im DynaMiTES ab der Einsaat	109
4.4.4	Zusammenfassende Diskussion zur Kultivierung von hCMEC/D3 Zellen im <i>Cerebral</i> DynaMiTES	110
4.5	Kultivierung weiterer Zelllinien im DynaMiTES	117
4.5.1	Konfluenz der MDCK Zellen	118
4.5.2	Zell- und Barriereigenschaften der MDCK Zellen	119
4.5.3	TEER-Verlauf der MDCK Zellen im DynaMiTES	120
4.5.4	Zusammenfassende Diskussion zur Kultivierung von weiteren Zelllinien im DynaMiTES	121
4.6	Einflussfaktoren des DynaMiTES auf die Barriereintegrität von MDCK Zellen	122
4.6.1	Variationen der DynaMiTES-Kultivierung unter Beteiligung einzelner Ebenen	125
4.6.2	Einfluss des Dichtungsringes	128
4.6.3	Zusammenfassende Diskussion der Einflussfaktoren des DynaMiTES auf die Barriereintegrität von MDCK Zellen	129
5	ABSCHLUSSDISKUSSION	131
6	ZUSAMMENFASSUNG	142
7	ABSTRACT	144
8	LITERATURVERZEICHNIS	146
9	ANHANG	181

1 Einleitung und Problemstellung

Das menschliche Gehirn ist ein komplexes Organ und die Schaltzentrale des Organismus. Es besteht aus Milliarden Neuronen, die über Axone und Dendriten miteinander verbunden sind und die als Teil des zentralen Nervensystems (ZNS) die Körperfunktionen regulieren. Die Komplexität des Gehirns spiegelt sich auch in der Forschung und Entwicklung neuer Arzneimittel für die Therapie zentralnervöser Erkrankungen wider. Der Zeitraum von der Entwicklung eines ZNS-wirksamen Medikaments bis zu seiner Markteinführung beträgt 10 bis 16 Jahre und ist damit überdurchschnittlich lang (Karande et al. 2015). Über 90 % der vielversprechenden Arzneimittelkandidaten scheitern in klinischen Studien der Phasen II und III (Hartung 2013; Kola und Landis 2004). Oftmals gelangen ZNS-Therapeutika nach einer Resorption in den Blutkreislauf nicht zu ihrem eigentlichen Wirkort. Eine Hauptursache stellt die Blut-Hirn-Schranke (BHS) dar, die aufgrund ihrer Barriere- und Schutzfunktion die Wirkstoffpermeation ins Gehirn deutlich einschränkt. Betroffen sind hiervon alle mittelgroßen Moleküle und hochmolekularen Arzneistoffe. Darüber hinaus können über 98 % aller kleineren Moleküle die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden (Pardridge 2003). Durch Efflux-Transportern und die Bindung an Blut- und Gehirnkomponten wird zusätzlich die Konzentration freier Wirkstoffmoleküle eingeschränkt.

Um Tierversuche zu reduzieren und den Zeit- und Kostenaufwand der Arzneimittelentwicklung zu verringern, werden realitätsnahe *in vitro*-Zellkulturmodelle benötigt, die in der frühen Entwicklungsphase eine realistische Abschätzung der Gehirnexposition der Arzneimittelkandidaten ermöglichen. Weit verbreitet ist das statische Transwell™-Modell mit der humanen zerebralen Endothelzelllinie hCMEC/D3 (Weksler et al. 2013). Es ermöglicht eine einfache Handhabung, gute Reproduzierbarkeiten und einen hohen Durchsatz. Neben diesen Vorteilen bleibt die Herausforderung bestehen, dass die Endothelzellen eine ausreichend hohe Barrierefunktion ausbilden. Die Barriereintegrität wird mit Hilfe des transendothelialen elektrischen Widerstands (TEER) quantifiziert. Der physiologische TEER von zerebralen Gehirngefäßen wird auf über $1500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ geschätzt (Butt et al. 1990; Crone und Olesen 1982). Demgegenüber bilden die hCMEC/D3 Zellen unter herkömmlichen Bedingungen meist einen TEER unter $50 \Omega \cdot \text{cm}^2$ aus (Rahman et al. 2016). Dies

verdeutlicht die Schwierigkeiten bei der Übertragung der *in vitro*-Ergebnisse auf die physiologischen Bedingungen. Die vorliegende Arbeit behandelt daher den Einfluss verschiedener Kultivierungsbedingungen auf die Eigenschaften der hCMEC/D3 Zelllinie im Hinblick auf ein optimiertes *in vitro*-Zellkulturmodell für Permeationsstudien.

Das statische Modell lässt wichtige Aspekte unberücksichtigt, wie die mikrovaskuläre Umgebung, den Blutfluss und die Scherspannung auf die Zellen. Aus diesem Grund haben mikrofluidische Zellkulturmodelle in den letzten Jahrzehnten immer mehr an Bedeutung gewonnen. Es gibt hierzu verschiedene Ansätze wie *BBB on Chip* (Griep et al. 2013), μ *BBB* (Booth und Kim 2014) oder *B³C* (Deosarkar et al. 2015). So konnte gezeigt werden, dass sich eine dynamische Kultivierung positiv auf die Barriereintegrität der zerebralen Endothelzellen auswirkt. Nachteilig ist, dass die mikrofluidischen Systeme häufig in ihrer Funktionalität noch nicht ausreichend entwickelt sind. Darüber hinaus lassen sie sich nur schwer an bestehende Protokolle anpassen oder mit den herkömmlichen statischen Modellen vergleichen. Zudem ist die Handhabung oft zeitaufwendig und anspruchsvoll (Sivandzade und Cucullo 2018). Aus der Idee heraus die Vorteile des statischen Transwell™-Modells mit denen von mikrofluidischen Systemen zu kombinieren, entstand das *Dynamic Micro Tissue Engineering System* – DynaMiTES (Beißner et al. 2018; Mattern et al. 2018).

Auf dieser Grundlage ergaben sich für diese Arbeit folgende Fragestellungen:

1. Ist die funktionelle Barriereintegrität der hCMEC/D3 Zelllinie in der vorliegenden Untersuchung vergleichbar mit den Literaturangaben?
2. Welchen Einfluss haben verschiedene statische Kultivierungsvariationen auf die Eigenschaften der hCMEC/D3 Zelllinie?
3. Ist die hCMEC/D3 Zelllinie geeignet für ein *in vivo*-ähnliches statisches Blut-Hirn-Schranke-Modell?
4. Lassen sich die Bedingungen der herkömmlichen Kultivierung an eine Kultivierung im *Cerebral* DynaMiTES anpassen?
5. Welchen Einfluss hat eine Kultivierung im *Cerebral* DynaMiTES auf die Eigenschaften der hCMEC/D3 Zellen?
6. Ist das DynaMiTES für weitere Zelllinien anwendbar und welche Möglichkeiten ergeben sich hieraus?

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Die Blut-Hirn-Schranke

Im Jahr 1885 stieß der Immunologe Paul Ehrlich auf eine Barriere zwischen dem Blutkreislauf und dem Hirngewebe. Er fand in experimentellen Studien heraus, dass das Injizieren von hydrophilen Vitalfarbstoffen in den Blutkreislauf von Tieren zu einer Färbung aller Organe führte mit Ausnahme des Rückenmarks und des Gehirns. Ehrlich führte dieses Phänomen auf unterschiedliche Bindungsaffinitäten zurück (Saunders et al. 2014). In aufbauenden Experimenten beobachtete Edwin Goldmann nach der Injektion des Farbstoffs Trypanblau in die Gehirn-Rückenmarksflüssigkeit eine ausschließliche Färbung des ZNS (Goldmann 1913). Diese Untersuchungen bildeten die Grundlagen für die weitere Gehirnforschung und führten zur Prägung des Begriffes Blut-Hirn-Schranke im Jahr 1918 von Stern und Gautier (Saunders et al. 2014). Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte im Jahr 1967 die Blut-Hirn-Schranke als Endothelzellschicht innerhalb der zerebralen Kapillaren lokalisiert und charakteristische Zell-Zell-Kontakte nachgewiesen werden (Reese 1967).

Das zerebrale Kapillarsystem ist aufgrund des hohen Energie- und Sauerstoffbedarfs des Gehirns stark entwickelt. Etwa 100 Milliarden Kapillaren durchziehen mit einer geschätzten Gesamtlänge von 600 km und einer Gesamtoberfläche der Gefäßinnen-seite von 20 m² das menschliche Gehirn, wobei die größte Kapillardichte in der Großhirnrinde vorliegt. Zerebrale Kapillaren haben einen Durchmesser von 4 bis 8 µm und bestehen aus kontinuierlich aneinandergereihten 0,2 µm hohen Endothelzellen, die an ihren Berührungspunkten durch Zell-Zell-Kontakte dicht miteinander verbunden sind (Wilhelm et al. 2016; Fricker et al. 2014; Pardridge 2005). Die dichten Kontaktproteine der Endothelzellen tragen zu einer ausgeprägten Barriereintegrität und selektiven Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke bei. Es resultiert ein hoher spezifischer Widerstand des zerebralen Kapillarendothels, der als TEER bezeichnet wird (Rutten et al. 1987). Frühere Studien haben die Barrieredichtigkeit von zerebralen Mikrogefäßen in Tieren durch TEER-Messungen quantifiziert und mit denen in anderen Organen des Körpers verglichen. So wurde an den Mikrogefäßen von Fröschen ein TEER von 1870 Ω · cm² (Crone und Olesen 1982) und an den

Kapillaren von Ratten innerhalb der zur Hirnhaut gehörenden Pia Mater ein TEER von $1500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Butt et al. 1990) nachgewiesen. Der Widerstand von Kapillaren, die sich im Hirnparenchym befinden, konnte bisher nicht direkt gemessen werden. Allerdings wird dort der TEER *in vivo* aufgrund ermittelter Permeabilitätskoeffizienten von radioisotopen Ionen auf ca. $8000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ geschätzt (Smith und Rapoport 1986). Im Vergleich dazu liegt der TEER von peripheren Kapillaren häufig in einer Größenordnung von 3 bis $33 \Omega \cdot \text{cm}^2$ und ist damit um ein Vielfaches niedriger (Butt et al. 1990; Olesen 1985; Olesen und Crone 1983).

Die Blut-Hirn-Schranke stellt eine der dichtesten Barrieren im Organismus von Säugetieren dar. Sie sorgt dafür, dass die komplexe Funktionsweise des Gehirns durch Aufrechterhaltung der Homöostase sichergestellt und metabolische Schwankungen des Blutes nicht weitergeleitet werden. Eine konstante ionische Zusammensetzung schützt das neuronale Gewebe vor Störungen der synaptischen und axonalen Signalübertragung. Sie trennt zentral und peripher wirkende neuroaktive Substanzen und Neurotransmitter, damit diese unabhängig voneinander arbeiten und die neuronale Mikroumgebung regulieren können. Zudem wird durch die Barriere das Passieren von toxischen Substanzen, Xenobiotika und Krankheitserregern vom Blutkreislaufsystem ins Gehirn verhindert, gleichzeitig aber die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff sowie der Abtransport von Stoffwechselprodukten durch verschiedene Transportprozesse sichergestellt (Pardridge 2012; Abbott et al. 2010; Hawkins und Davis 2005).

Eine weitere Schutzbarriere im Gehirn ist die Blut-Liquor-Schranke. Hierbei handelt es sich um eine physiologische Barriere zwischen dem Liquor-System des Gehirns und dem Blutkreislauf, die sich aus dem Kapillarendothel der Blutgefäße, der Basalmembran und dem Epithel der Plexus choroidei zusammensetzt. Insgesamt weist die Blut-Liquor-Schranke sehr viel geringere Barriereigenschaften auf als die Blut-Hirn-Schranke (Pardridge 2016).

2.1.1 Anatomie der Blut-Hirn-Schranke

Für den Aufbau und die Funktion der Blut-Hirn-Schranke ist die Interaktion der gesamten neurovaskulären Einheit (*neurovasculare unit*, NVU) von Bedeutung. Sie setzt sich zusammen aus den Endothelzellen, den Perizyten, der Basalmembran, den Astrozyten sowie den Neuronen und Mikrogliazellen (Abbildung 1). Im folgenden Abschnitt werden die wichtigsten Zelltypen näher erläutert.

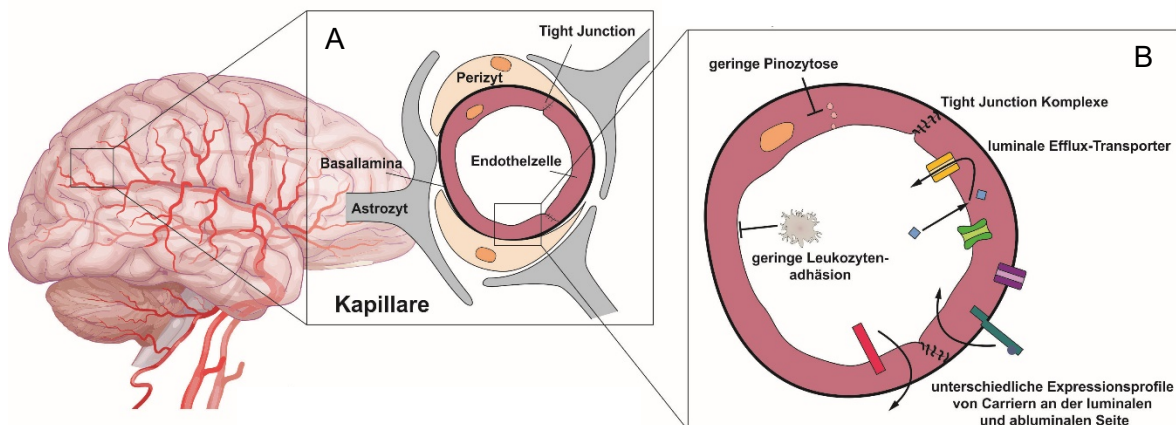


Abbildung 1: Die neurovaskuläre Einheit stellt ein Zusammenspiel mehrerer Zelltypen dar, darunter Endothelzellen, Perizyten und Astrozyten (A). Die zerebralen Endothelzellen bilden die Grundstruktur und weisen wesentliche Unterschiede zu den peripheren Endothelzellen auf, wie z. B. eine geringe Pinozytoserate und geringe Leukozytenadhäsion (B). Abbildung von (Storck und Pietrzik 2018)

2.1.1.1 Zerebrale Endothelzellen

Viele Eigenschaften der Blut-Hirn-Schranke sind auf die spezialisierten Endothelzellen zurückzuführen. Sie kleiden die Innenseite der Kapillargefäße im Gehirn aus, wobei eine Zelle den gesamten Kapillariumumfang umfasst. Die zerebralen Endothelzellen unterscheiden sich in einigen Merkmalen wesentlich von den peripheren Endothelzellen (Wilhelm et al. 2016; Goldstein und Betz 1986). Sie gehören dem kontinuierlichen Kapillartyp an, der nur im Gehirn und im Rückenmark vorkommt und durch das Fehlen von Fenestrierungen und Interzellularspalten geprägt ist (Wilhelm et al. 2016; Fenstermacher et al. 1988). Ein weiteres spezifisches Merkmal dieser Endothelzellen ist ihr Zytoplasma, das nur eine geringe pinozytotische Aktivität aufweist, wodurch der transzelluläre Stoffaustausch stark begrenzt wird (Defazio et al. 1997; Coomber und Stewart 1985; Stewart und Wiley 1981b).

Die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke weisen, verglichen mit anderen Endothelzellen, eine fünf- bis zehnfach erhöhte Mitochondriendichte auf. Das lässt auf eine verstärkte metabolische Aktivität schließen, bedingt u. a. durch die hohe Stoffwechselaktivität des Gehirns und energieverbrauchende Transportmechanismen (Fenstermacher et al. 1988; Oldendorf et al. 1977; Oldendorf und Brown 1975). Darüber hinaus liegen intrazelluläre und extrazelluläre Enzyme wie die γ -Glutamyl-transpeptidase oder die Monoaminoxidase in höheren Konzentrationen vor und stärken damit die Barriereigenschaften auf metabolischer Ebene (Méresse et al. 1989). Des Weiteren hat eine vergleichende Analyse gezeigt, dass zerebrale Kapillarendothelzellen eine signifikant geringere Wanddicke aufweisen als z. B. die Endothelzellen aus Muskelkapillaren. Dieser Unterschied kann angesichts der hohen Stoffwechselanforderung als eine Anpassung an die eingeschränkte Durchlässigkeit gesehen werden. Durch die dünnere Endothelzellschicht wird ein effektiver Transport von essenziellen Nährstoffen mit verkürzten Diffusionszeiten ermöglicht (Coomber und Stewart 1985).

Einige Regionen des ZNS weisen nicht den klassischen zerebralen Endothelzelltyp der Blut-Hirn-Schranke auf, sondern haben Mikrogefäße mit Fenestrierungen und einer hohen Permeabilität, die den Endothelzellen in der Peripherie ähneln. Diese Bereiche liegen angrenzend an den dritten und vierten Hirnventrikeln und werden als zirkumventrikuläre Organe bezeichnet, so das *Organum subfornicale*, die Neurophyse, das *Organum vasculosum laminae terminalis* oder die *Area postrema* (Ganong 2000).

2.1.1.1.1 Tight Junctions

Die Endothelzellen sind durch dichte Zell-Zell-Kontakte miteinander verbunden, welche die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke regulieren. Zu den wichtigsten Vertretern der Zell-Zell-Kontakte zählen die *Tight Junctions* (TJs), auch als *Zonulae occludentes* bezeichnet (Abbildung 2). Hierbei handelt es sich um leistenförmige Kontaktstellen der äußeren Zellmembranen von angrenzenden Zellen. Die TJs befinden sich im apikalen Bereich der lateralen Zellmembran und haben einen Durchmesser von 10 bis 20 nm und eine Länge von 20 bis 50 nm mit Zwischenräumen von 50 bis 200 nm (Haseloff et al. 2015). Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Gefrierbruchaufnahmen lassen sich die TJs morphologisch als kontinuierliche Stränge

aus Intramembranpartikeln identifizieren. Bei den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke sind diese Stränge ungefähr zur Hälfte mit der protoplasmatischen (*P-face*) Membranseite assoziiert und zur anderen Hälfte bilden sie komplementäre Furchen auf der exoplasmatischen Membranseite (*E-face*). Die *P-face*-Assoziation korreliert hierbei mit der Dichtigkeit der Barriere (Wolburg et al. 2003; Kniesel et al. 1996).

Auf Basis der Molekülgröße und der Ladung stellen die TJs der Blut-Hirn-Schranke eine parazelluläre sowie intramembranöse Diffusionsbarriere dar (Zihni et al. 2016). Sie setzen sich aus verschiedenen Transmembranproteinen sowie membranassoziierten Gerüst- und Adapterproteinen zusammen, dargestellt in Abbildung 2 (Bauer et al. 2014). Zu den Transmembranproteinen zählen die junctionalen Adhäsionsmoleküle (JAMs), Proteine der TAMP-Familie (*TJ-associated MARVEL proteins*), darunter Occludin und Tricellulin, und verschiedene 4-Transmembranproteine, zu denen die Vertreter der Claudin-Proteinfamilie gehören. Zu den Gerüst- und Adapterproteinen zählen die *Zonula occludens* (ZO) Proteine 1 bis 3 und MUPP-1 (*multi-PDZ-domain protein-1*) (Haseloff et al. 2015).

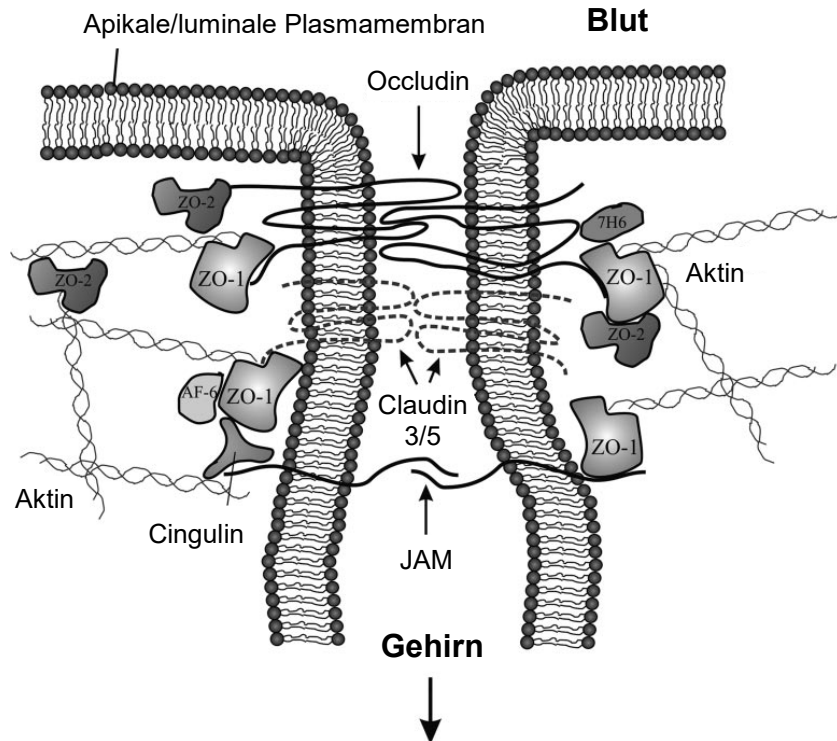


Abbildung 2: Schematische Übersicht der TJs zweier benachbarter Endothelzellen der BHS; die apikale Seite ist zum Kapillarlumen hingerrichtet (Blut) und die basolaterale Seite ist vom Kapillarlumen abgewendet (Gehirn). Abbildung modifiziert nach (Hawkins und Davis 2005)

ZO-1 war das erste identifizierte TJ-assozierte Protein (Stevenson et al. 1986). Das Zytoplasmaprotein ist über prolinreiche Abschnitte mit dem Aktin-Zytoskelett und über seine PDZ-Domäne mit den Transmembranproteinen, darunter Claudine, JAMs und Occludin, verbunden (van Itallie et al. 2009; Fanning et al. 1998). Neben der Gerüstfunktion übernimmt es wesentliche Funktionen für die Signaltransduktion und die Genregulation (Tornavaca et al. 2015). Die Proteine ZO-2 und ZO-3 stehen in einer direkten Verbindung mit ZO-1. In der N-terminalen Hälfte weisen sie die gleiche Domänenstruktur auf, unterscheiden sich aber in ihren C-terminalen Bereichen zu ZO-1 (Fanning et al. 1998).

Occludin wurde als erstes Transmembranprotein in den TJs von Hühnern identifiziert. Es besteht aus vier Transmembrandomänen und zwei hydrophoben extrazellulären Schleifen (Furuse et al. 1993). Das Protein weist eine Größe von ca. 60 kDa auf und wird häufig als Markerprotein eingesetzt, da es in nahezu allen TJs exprimiert wird (Haseloff et al. 2015). Occludin ist ein wichtiger Bestandteil der Diffusionsbarriere. Es hat sich gezeigt, dass eine Überexpression in Epithelzellen von Säugetieren zu einem TEER-Anstieg führte (Balda et al. 1996). Eine Transfektion mit Occludin cDNA bewirkte zwar in Insektenzellen die Expression von scheinbaren Fusionsstellen und kurzen strangähnlichen Strukturen, jedoch keine Ausbildung von eigenständigen TJ-Strängen (Furuse et al. 1996). Darüber hinaus zeigte sich anhand von *Knock-out*-Mäusen, dass das Fehlen von Occludin die TJ-Morphologie nicht beeinträchtigte und die Barrierefunktion des Darmepithels unverändert blieb. Allerdings wurden im Rahmen dieser Untersuchungen abnorme Histopathologien in mehreren Geweben festgestellt (Saitou et al. 2000). Außerdem scheint Occludin eine wesentliche Komponente der TJs darzustellen, indem es z. B. mit den Claudinen interagiert (Furuse et al. 1998b) und Signale von Zytokinen wie den Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) und Interferon- γ (IFN γ) überträgt (van Itallie et al. 2010). *In vitro*-Untersuchungen zeigten, dass eine Zugabe von Glukokortikoiden ins Medium die Barriereintegrität der Endothelzellen erhöhte, wobei als direktes Target Occludin vermutet wurde (Förster et al. 2008).

Zu den bedeutsamsten Transmembranproteinen zählt mit einem Molekulargewicht von 20 bis 34 kDa das TJ-Protein Claudin. Bisher sind 27 Mitglieder der Claudin-Familie in Säugetieren nachgewiesen worden, wobei es große gewebs- und spezie-spezifische Unterschiede gibt und nicht alle Claudine gleichermaßen exprimiert werden (Berndt et al. 2019). Die Claudine sind, ähnlich wie Occludin, an Serin- oder Threoninresten phosphoryliert und intrazellulär lokalisiert. Die Aufgaben der Claudine lassen sich in drei Hauptbereiche einteilen: die Abdichtung des Parazellularraums (Claudin-1, -3, -5, -11), die Bildung parazellulärer Ionenporen (Claudin-2, -10, -16) und die Unterstützung der Barriere in ihrer Entwicklung (Claudin-6, -13). Relevante Claudin-Vertreter des menschlichen zerebralen Endothels sind Claudin-1, -3, -5 und -12, wobei Claudin-5 am stärksten exprimiert wird (Berndt et al. 2019; Dias et al. 2019; Krause et al. 2008; Wolburg et al. 2003; Nitta et al. 2003). Der Anteil der Claudin-5 mRNA ist fast 600-mal höher im Vergleich zu anderen Claudinen (Ohtsuki et al. 2008; Ohtsuki et al. 2007). Das Ausschalten des Claudin-5-Gens in *Knock-out*-Mäusen führte dazu, dass die Blut-Hirn-Schranke für Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 800 Da durchlässig wurde und die Mäuse nach einiger Zeit verstarben (Nitta et al. 2003). Im Unterschied zu Occludin sind Claudine in der Lage *de novo*-TJ-Stränge in TJ-freien Maus-Fibroblasten zu rekonstruieren (Furuse et al. 1998a). Sie gelten als Rückgrat der TJs und bestimmen durch ihre Zusammensetzung maßgeblich die Barriereigenschaften der Endothelzellen (Günzel und Yu 2013; Ohtsuki et al. 2007).

Neben den TJs sind die sogenannten *Adherens Junctions* (AJs) für die Zell-Zell-Kontakte essentiell. In zerebralen Endothelzellen sind – im Unterschied zu den Epithelzellen – die AJs gemeinsam mit den TJs über den gesamten Interzellularspalt verteilt (Schulze und Firth 1993). Sie tragen durch Interaktionen zwischen den Aktinfilamenten und den Ankerproteinen zur mechanischen Stabilität bei. Die AJs sind für die TJs von zentraler Bedeutung, da sie vor deren Bildung die Kontakte zwischen den Zellen initiieren und deren weitere Reifung und Erhaltung fördern (Tietz und Engelhardt 2015). Eines der wichtigsten AJ-Proteine, das wesentlich zur Barriereintegrität beiträgt, ist das vaskuläre endotheliale Cadherin (VE-Cadherin). Die VE-Cadherin-Expression beeinflusst die Claudin-5-Expression und nimmt somit auch Einfluss auf die Gefäßpermeabilität (Taddei et al. 2008).

2.1.1.2 Perizyten

Perizyten sind Bindegewebszellen, die ungefähr 20 bis 30 % der basolateralen Gefäßoberfläche bedecken (Frank et al. 1987). Sie befinden sich hauptsächlich an den Kontaktpunkten zweier Endothelzellen, was auf eine Funktion zur mechanischen Stabilisierung des Endothels und zur Unterstützung der Dichtigkeit hindeutet. Über Perizyten-Endothel-Kontakte, die in *Gap Junctions*, *Adhesions Plaques* und *Peg-and-Socket-Invaginationen* unterschieden werden können, sind die Perizyten direkt mit den Endothelzellen verbunden (Winkler et al. 2011; Tell et al. 2006; Rucker et al. 2000; Fujimoto 1995). Im Gehirn können die Perizyten in granular und agranular klassifiziert werden, wobei beim Menschen weniger als 5 % der Perizytenpopulation agranular sind (Farrell et al. 1987). *In vitro*-Untersuchungen haben gezeigt, dass Perizyten einen höheren Anteil des kontraktilen Proteins Aktin aufweisen als andere Zelltypen. Es wird daher vermutet, dass sie mit Hilfe ihrer Zellfortsätze Einfluss auf den Kapillardurchmesser haben (Oishi et al. 2007). Außerdem wird den Perizyten eine zweite Abwehrfunktion (*second line of defence*) zugesprochen, indem kleinere Moleküle, die die Endothelzellen bereits passiert haben, phagozytiert werden (Frey et al. 1991; Farrell et al. 1987). Ohne direkt auf die endotheliale Genexpression einzuwirken, fördern die Perizyten die Ausbildung der TJs und den vesikulären Transport (Daneman et al. 2010). Durch die Produktion von Wachstumsfaktoren, wie *basic fibroblast growth factor* (bFGF), *vascular endothelial growth factor* (VEGF) oder *transforming growth factor beta* (TGF- β), interagieren die Perizyten mit den Endothelzellen (Thanabalasundaram et al. 2010; Dohgu et al. 2005). Die Funktion der Perizyten und das Zusammenspiel mit den Endothelzellen sind sehr komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt.

2.1.1.3 Astrozyten

Astrozyten sind sternförmig verzweigt und stellen die größten Gliazellen des Organismus dar. Sie bedecken mit ihren Endfortsätzen bis zu 99 % der basolateralen Oberfläche der Gehirnkapillaren (Mathiisen et al. 2010). Zu ihren Funktionen gehören die Nährstoffversorgung der Neuronen, die Regulation der extrazellulären Ionenkonzentration und des Blutflusses sowie die Bildung von zerebralen Cholesterol, das u. a. im Myelin vorkommt (Kiray et al. 2016; Abbott et al. 2006). Durch die

Kanalproteine Aquaporin 4 und *Potassium inwardly-rectifying channel* Kir4.1 in den Endfortsätzen werden die Wasseraufnahme und das Ionengleichgewicht reguliert (Nagelhus et al. 2004; Verkman 2002). Transplantationsversuche haben gezeigt, dass sich die zerebralen Endothelzellen in Abwesenheit von zerebralen Astrozyten den peripheren Endothelzellen annähern und umgekehrt (Stewart und Wiley 1981a). Folglich scheinen die Astrozyten wesentlich an der Differenzierung und Proteinexpression der Endothelzellen beteiligt zu sein. Durch die Induktion von VEGF, TGF- β , *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) und Angiopoietin-1 sind Astrozyten an der Modulation der Barriere beteiligt (Abbott et al. 2006; Igarashi et al. 1999). Einige *in vitro*-Untersuchungen belegen, dass Ko-Kulturen, bestehend aus Endothelzellen und Astrozyten, im Vergleich zu Mono-Kulturen höhere TEER-Werte aufweisen. Außerdem können Astrozyten gemeinsam mit den Endothelzellen zum Schutz vor oxidativem Stress, der ein Auslöser für viele Krankheitsbilder sein kann, die Ausschüttung von antioxidativen Enzymen regulieren (Abbott et al. 2006).

2.1.1.4 Die Basalmembran

Die Endothelzellen werden von einer Basalmembran umgeben, in die Perizyten eingebettet und Astrozyten aufgelagert sind. Auf diese Weise wird die endotheliale Zellschicht von ihrem benachbarten Gewebe abgetrennt. Die Basalmembran besteht aus verschiedenen extrazellulären Matrixproteinen und Proteoglykanen und weist einen mehrschichtigen Aufbau auf. Der an die Endothelzellen angrenzende Teil wird als Basallamina bezeichnet. Sie weist eine Dicke von 30 bis 40 nm auf (Fricker et al. 2014). Die Basalmembran im Gehirn unterscheidet sich in ihrer Zusammensetzung von der Basalmembran in den peripheren Gefäßen. Zu den Hauptkomponenten der zerebralen Basalmembran zählen die Proteine Kollagen IV, Laminin und Fibronectin (Tilling et al. 2002). Die Kollagen- und Laminin-Netzwerke werden durch Heparansulfat-Proteoglykane miteinander verbunden. Das Faserprotein Kollagen IV gibt der Membran ihre Struktur und den nötigen Halt und fördert zudem die Zelladhäsion. Neben der stabilisierenden Funktion beeinflusst die Basalmembran die Filtrationskapazität, die Zellmigration von Immunzellen und die intrazelluläre Kommunikation (Arnaoutova et al. 2009). Die einzelnen Komponenten werden von den Endothelzellen und Perizyten exprimiert. Beispielsweise werden die Laminine $\alpha 4$ und

$\alpha 5$ hauptsächlich von den Endothelzellen und das Laminin $\alpha 2$ von den Perizyten gebildet (Yousif et al. 2013). Die Endothelzellen sind über Integrin-Rezeptoren mit der Basalmembran verbunden (Fricker et al. 2014). *In vitro*-Untersuchungen haben gezeigt, dass die Barriereintegrität und die Zelladhäsion von primären zerebralen Endothelzellen durch die Kultivierung auf einer Beschichtung aus Kollagen IV, Fibronectin und Laminin deutlich verbessert wurden. Es wird außerdem vermutet, dass die endotheliale Produktion von endogenen extrazellulären Matrixproteinen durch das Matrixsubstrat selbst reguliert wird (Tilling et al. 1998).

2.1.2 Transportprozesse der Blut-Hirn-Schranke

Ein Substanztransport durch die Blut-Hirn-Schranke erfolgt meist transzellulär und nur für wenige Moleküle wie Harnstoff oder Glycin parazellulär. Abhängig von den Moleküleigenschaften gibt es verschiedene transzelluläre Wege (Abbildung 3). Lipophile Moleküle mit einem Molekulargewicht von 400 bis 600 Da können die Blut-Hirn-Schranke durch passive Diffusion passieren (Pardridge 1995). So gelangen die meisten ZNS-Therapeutika zu ihrem Wirkort (Georgieva et al. 2014). Durch die passive Diffusion können Sauerstoff und Kohlendioxid die Blut-Hirn-Schranke leicht überwinden, wohingegen hydrophile oder hochmolekulare Moleküle nicht hindurch diffundieren können. Um die Nährstoffversorgung des Gehirns dennoch zu gewährleisten, liegen verschiedene Transportsysteme in der Blut-Hirn-Schranke vor. Substrate, die über sogenannte *Carrier*-Proteine transzellulär auf die basolaterale Seite transportiert werden, sind z. B. Glukose (Pardridge et al. 1990), verschiedene Aminosäuren (Pardridge und Oldendorf 1975), Carbonsäuren (Oldendorf 1973) und Choline (Cornford et al. 1978). Hochmolekulare Substanzen und Peptide werden mittels Endozytose in die Endothelzellen aufgenommen oder mittels Transzytose durch das Endothel transportiert. Substanzen wie Insulin, Antikörper oder Transferrin werden bei der rezeptorvermittelten Endozytose an die spezifischen Rezeptoren der luminalen Membranseite gebunden und anschließend in Vesikeln zur basolateralen Seite transportiert. Kationische Lipide oder Albumin werden durch adsorptionsvermittelte Endozytose aufgenommen, indem sie mit den negativ geladenen Zelloberflächen durch elektrostatische Wechselwirkungen interagieren (Georgieva et al. 2014).

Aktive Efflux-Transporter und metabolische Enzyme sind darauf ausgelegt, das Gehirn vor Xenobiotika zu schützen und erschweren zusätzlich die Permeation von Arzneistoffen. Zu den Efflux-Transportern der Blut-Hirn-Schranke zählen die ATP-bindenden Kassettenproteine (ABC-Proteine) wie das P-Glykoprotein (P-gp), die *multidrug resistance-related proteins* (MRPs) und das *breast cancer resistance protein* (BCRP) (Löscher und Potschka 2005). Immunocytochemische Untersuchungen haben ergeben, dass Subtypen der ABC-Transporter nicht nur in zerebralen Endothelzellen, sondern auch in Astrozyten und Perizyten innerhalb der Membran lokalisiert sind (Hartz und Bauer 2011; Shimizu et al. 2008).

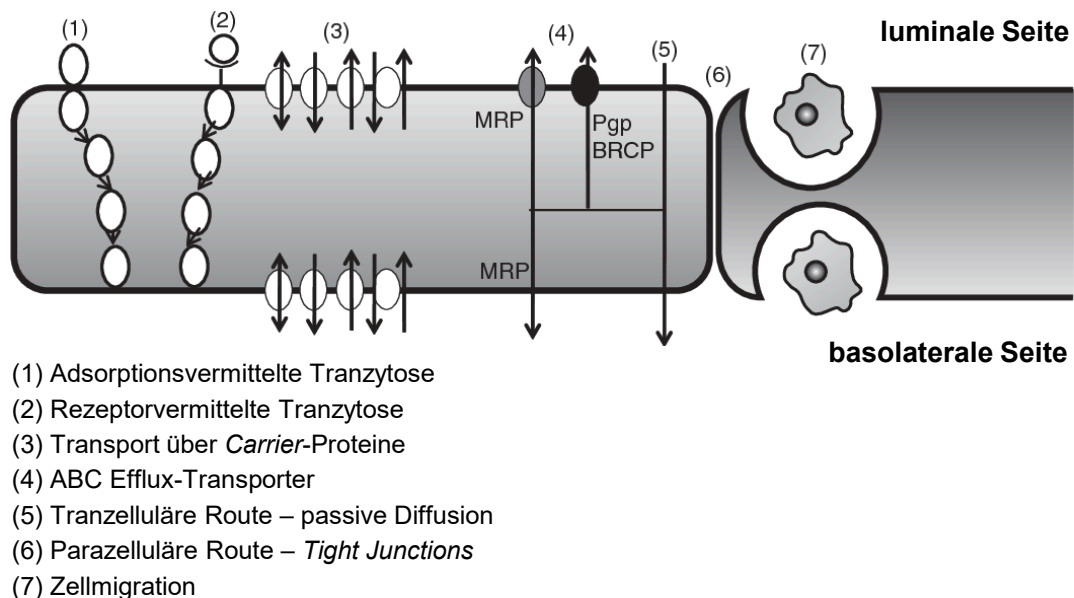


Abbildung 3: Schematische Darstellung der verschiedenen Transportprozesse durch die Blut-Hirn-Schranke; Abbildung modifiziert nach (Ganta et al. 2010)

2.2 Schädigung der Blut-Hirn-Schranke

Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke führen zu einer negativen Beeinflussung des neuronalen Zustands. Bei seltenen genetisch bedingten Krankheiten, wie der Biotin-responsiven Basalganglienerkrankung (Distelmaier et al. 2014) oder dem GLUT-1-Defizit-Syndrom (Wang et al. 2000), kann eine Schädigung der Barriere der Ausgangspunkt für neurologische Entwicklungs- und Funktionsstörungen sein.

Jedoch weitaus häufiger wird die Blut-Hirn-Schranke als Folge neurologischer Erkrankungen geschädigt. Hierzu gehören u. a. Multiple Sklerose, Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer, Epilepsie und traumatische Gehirnverletzungen, wobei sich Ursache und Auswirkung in einigen Fällen nicht eindeutig voneinander trennen lassen (Stanimirovic und Friedman 2012). Auch nicht-neurologische Erkrankungen wie Diabetes mellitus und Infektionskrankheiten können die Blut-Hirn-Schranke strukturell und funktionell beeinflussen (Hawkins und Egleton 2008). Unter pathologischen Bedingungen kann es zu einer vermehrten Expression von Oberflächenmolekülen und zu fehlenden bzw. desorganisierten TJs kommen (Weiss et al. 2009). So wurde bei Gehirntumoren ein Verlust der 55 kDa-Occludin-Expression festgestellt (Papadopoulos et al. 2001). Auch andere Erkrankungen wie Multiple Sklerose, eine entzündliche Autoimmunerkrankung des ZNS, werden mit einer verminderten TJ-Expression in Verbindung gebracht (McQuaid et al. 2009). Durch eine erhöhte Kapillardurchlässigkeit wird der Durchtritt von Entzündungszellen, Serumproteinen oder anderen neurotoxischen Plasmabestandteilen in das Gehirngewebe ermöglicht (Nicolas 2015). Auch die umliegenden Zellen sind an einer Öffnung der endothelialen Barriere beteiligt. So tragen Perizyten und Astrozyten durch Faktoren wie VEGF zu einer Regulation der TJ-Expression bei (Bai et al. 2015; Argaw et al. 2012). Die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke beschränkt sich nicht nur auf die Degeneration der physikalischen Barriere, sondern umfasst ebenso Veränderungen der Tranzytose und der Expression von Transportproteinen (Daneman und Prat 2015). Beispielsweise wird Morbus Alzheimer mit einer Dysregulation der ABC-Transporter in Verbindung gebracht, die zu einer Akkumulation von neurotoxischen Proteinen und Peptiden führt (Pahnke et al. 2014). All diese Veränderungen können zu Ödemen, einer gestörten Homöostase, einer Ansammlung von toxischen Substanzen in der Hirnzwischenraumflüssigkeit, einem Umbau der Gefäßversorgung, zu Neuroinflammation und einer veränderten synaptischen Plastizität führen und den weiteren Krankheitsverlauf beeinflussen (Nicolas 2015).

2.3 Modelle der Blut-Hirn-Schranke

Für die Forschung und Entwicklung neuer Arzneistoffe und Trägersysteme bilden die Modelle der Blut-Hirn-Schranke eine essenzielle Grundlage. Hierbei kann zwischen *in silico*-, *in vitro*- und *in vivo*-Modellen unterschieden werden. Das Ziel aller Modelle ist es, die komplexe *in vivo*-Situation und die Funktionalität der Blut-Hirn-Schranke so gut wie möglich abzubilden. Unter Anwendung solcher Modelle kann die Permeabilität potenzieller Wirkstoffe durch die Blut-Hirn-Schranke bestimmt werden. Basierend darauf lassen sich der Erfolg zentral wirksamer Substanzen oder die unerwünschten Nebenwirkungen peripher wirksamer Substanzen frühzeitig abschätzen. Erste Einschätzungen über die Permeation eines Arzneistoffes durch die Blut-Hirn-Schranke liefern *in silico*-Modelle mit Hilfe von komplexen Computersimulationen (Wang et al. 2015). Tierversuche, sogenannte *in vivo*-Modelle, gelten bis heute in der Wissenschaft als Goldstandard, da sie die Zellen in ihrer natürlichen Umgebung präsentieren und die Interaktionen mehrerer Zelltypen untereinander berücksichtigen (van der Helm et al. 2016a). Allerdings sind die *in vivo*-Techniken neben den ethischen Bedenken auch mit einem hohen Kosten- und Arbeitsaufwand verbunden. Zusätzlich sind die Eigenschaften von Zellkulturen aufgrund der genetischen, molekularen und zellulären Unterschiede nicht in jeder Hinsicht auf den Menschen übertragbar. Untersuchungen haben gezeigt, dass mehr als 80 % der Arzneimittelkandidaten, die zuvor erfolgreich an Tieren getestet wurden, in den klinischen Studien scheitern (Perrin 2014).

In der Grundlagenforschung und präklinischen Entwicklung werden zur Untersuchung von Arzneistoffen *in vitro*-Modelle herangezogen. Die einfachste Variante stellen zellfreie Modelle mit artifiziellen Membranen dar. Die Durchführung mit *Multiwell*-Zellkulturplatten erlaubt einen hohen Durchsatz bei einem geringen Kostenaufwand und einer hohen Reproduzierbarkeit. Ein bekanntes Modell ist das von Kansy et al. entwickelte PAMPA (*parallel artificial membrane permeation assay*) Permeabilitätsmodell (Kansy et al. 1998). In dem künstlichen System wird der Zellmonolayer durch einen mit Lipid imprägnierten Membranfilter abgebildet und die Permeabilität von Substanzen durch die Membran in das Akzeptor-Kompartiment bestimmt. Um die *in vitro-in vivo*-Korrelation zu verbessern, wurde das PAMPA-Modell hinsichtlich der Lipide, des pH-Wertes und der chemischen Zusammensetzung

optimiert und auf diese Weise an die Bedingungen der Blut-Hirn-Schranke angepasst (Müller et al. 2015; Di et al. 2003). Von Charles Pidgeon wurde eine chromatographische Methode mit artifiziellen Membranen entwickelt, die nicht weit verbreitet ist. Sie wird als IAM (*immobilized artificial membrane*) Chromatographie bezeichnet, bei der die stationäre Phase aus einer Phospholipid-Monoschicht besteht (Doležal et al. 2018; Grumetto et al. 2012; Pidgeon et al. 1995). Wesentliche Einschränkungen solcher zellfreier Modelle sind das Fehlen von relevanten Zellinteraktionen, Stoffwechselprozessen und aktiven Transportsystemen.

Die ersten zellbasierten *in vitro*-Modelle wurden mit isolierten Gehirnkapillaren tierischen Ursprungs durchgeführt (Joó 1985; Brendel et al. 1974). Frisch isolierte Kapillaren sind metabolisch aktiv und befinden sich in ihrem ursprünglichen Gewebeverband. Sie weisen wichtige Charakteristika wie Endothelrezeptoren und *Carrier*-Proteine auf und sind daher der *in vivo*-Situation sehr ähnlich (Bickel 2005). Die Isolierung von Gehirnkapillaren ist arbeitsintensiv und die Anwendungsmöglichkeiten sind durch die relativ kurze Lebensfähigkeit der Kapillaren eingeschränkt (Miller et al. 2002; Sussman et al. 1988). Oftmals sind die Kapillaren mit weiteren Zelltypen assoziiert, was die Zuordnung der Funktionen zu bestimmten Zelltypen erschwert (White et al. 1981). Aus diesen Gründen wurde der Fokus vermehrt auf die *in vitro*-Modelle mit kultivierten Zellmonolayern gelegt. Sie vereinen Vorteile wie Einfachheit, Kosteneffizienz und hohe Flexibilität (Abschnitt 2.3.3).

2.3.1 Statische *in vitro*-Modelle der Blut-Hirn-Schranke

Das am weitesten verbreitete Zellkulturmodell ist das statische Modell basierend auf einer *Multiwell*-Platte mit Zellkultureinsätzen, das häufig als Transwell™-Modell bezeichnet wird (Hajal et al. 2018; Kaisar et al. 2017). In dem Zellkultureinsatz befindet sich eine mikroporöse, semipermeable Filtermembran, die einen Austausch zwischen dem Akzeptor- und Donor-Kompartiment ermöglicht. Diese Membran besteht aus Materialien wie Polycarbonat (PC), Polytetrafluorethylen (PTFE) oder Polyethylenterephthalat (PET) und ist 10 bis 20 µm dick. Abhängig von der Anwendung variieren die Porengrößen zwischen 0,4, 1,0, 3,0 und 8,0 µm (Ye et al. 2015).

Üblicherweise werden die Endothelzellen auf der luminalen Seite entweder als Mono-Kulturmodell oder mit Astrozyten, Perizyten, Neuronen und/oder Mikrogliazellen als Ko- oder Triple-Kulturmodell kultiviert. Befinden sich die verschiedenen Zelltypen jeweils auf den gegenüberliegenden Membranseiten, bezeichnet man das als direkten Kontakt. Dagegen spricht man von einem indirekten Kontakt, wenn eine zelluläre Interaktion ausschließlich über das Medium erfolgen kann (Abbildung 4).

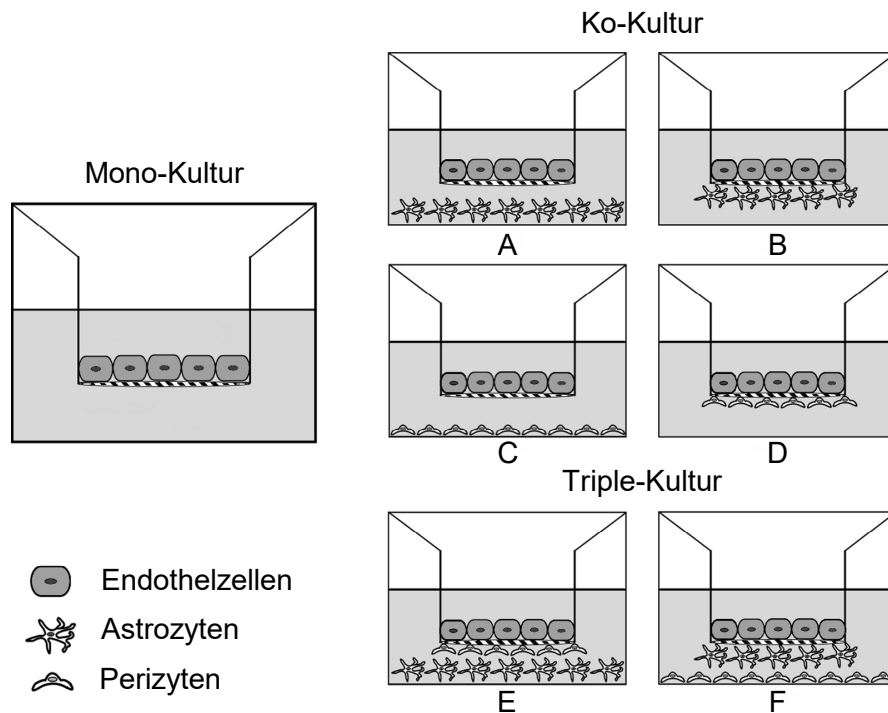


Abbildung 4: Statische *in vitro*-Transwell™-Modelle der Blut-Hirn-Schranke; Endothelzell-Mono-Kulturen werden durch eine indirekte (A, D) oder direkte (B, D) Kultivierung mit Astrozyten bzw. Perizyten zu Ko-Kulturen ergänzt. In Triple-Kulturen werden Endothelzellen mit zwei weiteren Zelllinien miteinander kultiviert (E, F). Abbildung modifiziert nach (Bicker et al. 2014)

Die Barriereintegrität wird durch die Messung des TEER-Wertes und die Bestimmung der Permeabilität von parazellulär transportierten Substanzen, wie Natriumfluoreszein oder FITC-Dextran, ermittelt. In der Vergangenheit wurden bereits verschiedene Ko-Kultivierungsvariationen von Endothelzellen mit Astrozyten untersucht. Die Untersuchungen zeigten, wie bedeutsam die interzelluläre Kommunikation für die Ausbildung einer ausgeprägten Endothelbarriere und die Entwicklung eines *in vivo*-ähnlichen Blut-Hirn-Schranke-Modells ist (Thomsen et al. 2015; Watson et al. 2013; Nakagawa et al. 2009; Gaillard et al. 2001). Die Verwendung eines konditionierten Astrozyten-Mediums kann durch die Sezernierung löslicher Faktoren, wie TGF- β , GDNF und bFGF, ebenfalls zu einer Verbesserung der Barriereeigenschaften führen

(Kuo und Lu 2011; Siddharthan et al. 2007; Fitsanakis et al. 2005; Sobue et al. 1999). Neben den Astrozyten haben auch Perizyten einen wichtigen Einfluss auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke (Armulik et al. 2010). Nakagawa et al. ermittelten bereits bei einem Ko-Kulturmodell aus primären Gehirnkapillar-Endothelzellen (*brain capillary endothelial cells*, BCECs) und Perizyten eine signifikante TEER-Steigerung. In der gleichnamigen Studie wurden auch Ko-Kulturen mit Astrozyten und Triple-Kulturen mit Perizyten und Astrozyten untersucht, wobei die Triple-Kultur mit einem direkten Kontakt zwischen den Endothelzellen und den Perizyten die höchsten TEER-Werte aufwies (Nakagawa et al. 2007). Auch die gemeinsame Kultivierung mehrerer Zelltypen auf einer Membranseite oder auf dem *Well*-Boden wurde in einigen Blut-Hirn-Schranke-Modellen als positiv bewertet (Toyoda et al. 2013; Vandenhaute et al. 2011). Interessanterweise wurde in einer Studie ein gegenteiliger Effekt der Perizyten auf die endotheliale Barriereintegrität gefunden. Als ursächlich wurden die von Perizyten sezernierten Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und der Wachstumsfaktor VEGF angesehen (Thanabalasundaram et al. 2010).

Durch die vielen Interaktionsmöglichkeiten verschiedener Zelltypen wird die neurovaskuläre Einheit gut abgebildet. Dennoch gibt es eine deutliche Diskrepanz zwischen den statischen Modellen und den *in vivo*-Bedingungen, da wichtige Parameter wie der Blutfluss, die Scherspannung oder die Gefäßdimensionen durch die statischen Modelle nicht abgedeckt werden.

2.3.2 Dynamische *in vitro*-Modelle der Blut-Hirn-Schranke

Dynamische Modelle werden dazu genutzt, laminare Strömungen entlang der Endothelzellen zu erzeugen und so den natürlichen Blutfluss zu imitieren. Im Unterschied zu den statischen Modellen wird durch den ständigen Durchfluss die Zusammensetzung des Zellkulturmediums konstant gehalten. Die resultierende Scherbeanspruchung ist entscheidend für den Phänotyp der Endothelzellen (Tarbell 2010). Untersuchungen haben gezeigt, dass hierbei apikale Mechanosensoren (Integrine, G-Proteine) und extrazellulär-signalregulierte Kinasen aktiviert werden (Cucullo et al. 2011a; Traub und Berk 1998). Außerdem wurde ein positiver Einfluss auf die endotheliale Barriere der Blut-Hirn-Schranke ermittelt, erkennbar an

höheren TEER-Werten und niedrigeren Permeabilitäten (Booth und Kim 2014; Griep et al. 2013; Cucullo et al. 2008; Siddharthan et al. 2007; Cucullo et al. 2002). Weitere Veränderungen finden auch auf metabolischer Ebene statt, wie der Anstieg der Dehydrogenase und der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Cucullo et al. 2008).

Um eine Scherspannung auf die Endothelzellen nachzubilden, wurden erste Versuche mit Kegel-Platte-Viskosimetern durchgeführt. Diese repräsentierten nur schwerlich die physiologischen Bedingungen und waren außerdem auf Mono-Kulturen begrenzt (Bussolari et al. 1982). Ein dynamisches Zellkulturmodell, das die dreidimensionale Architektur der Gehirnkapillaren darstellt, ist das DIV-Modell. In diesem Aufbau werden die Endothelzellen in Ko-Kultur an den Innen- und Außenwänden von porösen Kapillarbündeln kultiviert. Die Blut-Hirn-Schranke zeigte nach der Einwirkung von Flussbedingungen deutlich höhere TEER-Werte sowie geringere Permeabilitäten im Kontrast zu dem herkömmlichen statischen Modell (Cucullo et al. 2008). Trotz dieser Vorteile ist die Anwendung des DIV-Blut-Hirn-Schranke-Modells nicht weit verbreitet. Neben der relativ aufwendigen Handhabung und dem erhöhten Kostenaufwand ist auch eine visuelle Beurteilung der Zellen nicht möglich. Der Zellstatus wird anhand des Glukoseverbrauchs und der Laktatproduktion bewertet (Rochfort und Cummins 2019). Des Weiteren ist die 150 µm dicke Faserwand im Vergleich zu der Membrandicke bei anderen Modellen oder zu den physiologischen Bedingungen verhältnismäßig dick und der interzelluläre Kontakt dadurch stark eingeschränkt.

Mikrofluidische Systeme, sogenannte *Organ-on-chip* (OOC)-Systeme, berücksichtigen mikrovaskuläre Strukturen der Zellumgebung, strömungsinduzierte Scherspannungen sowie zelluläre Interaktionen bei einer gleichzeitigen Reduktion von Verbrauchsmaterialien und Testsubstanzen (Oddo et al. 2019). Mit Hilfe mikrotechnologischer Prozesse wird die Konstruktion von Kanalstrukturen im Mikrometermaßstab ermöglicht. Die Polymere Polymethylmethacrylat (PMMA) und Polydimethylsiloxan (PDMS) werden häufig für die Herstellung von Mikrosystemen mittels Soft-Lithographie-Verfahren eingesetzt. Sie ermöglichen die Herstellung von transparenten und gaspermeablen Zellkultursystemen (Damiati et al. 2018). Die Nachteile, insbesondere bei der Verwendung von PDMS, sind die adsorptiven Eigenschaften (Halldorsson et al. 2015; Paguirigan und Beebe 2009; Toepke und Beebe 2006).

Integrierte Sensoren ermöglichen die Online-Messungen verschiedener Parameter wie pH, Temperatur und TEER in Echtzeit (Kaisar et al. 2017). So dient die TEER-Analyse zur Überwachung der Barriereintegrität und wird entweder mit integrierten Elektroden (Walter et al. 2016; Booth und Kim 2014; Griep et al. 2013) oder mit einsetzbaren Elektroden (van der Helm et al. 2016b; Deosarkar et al. 2015; Brown et al. 2015) durchgeführt.

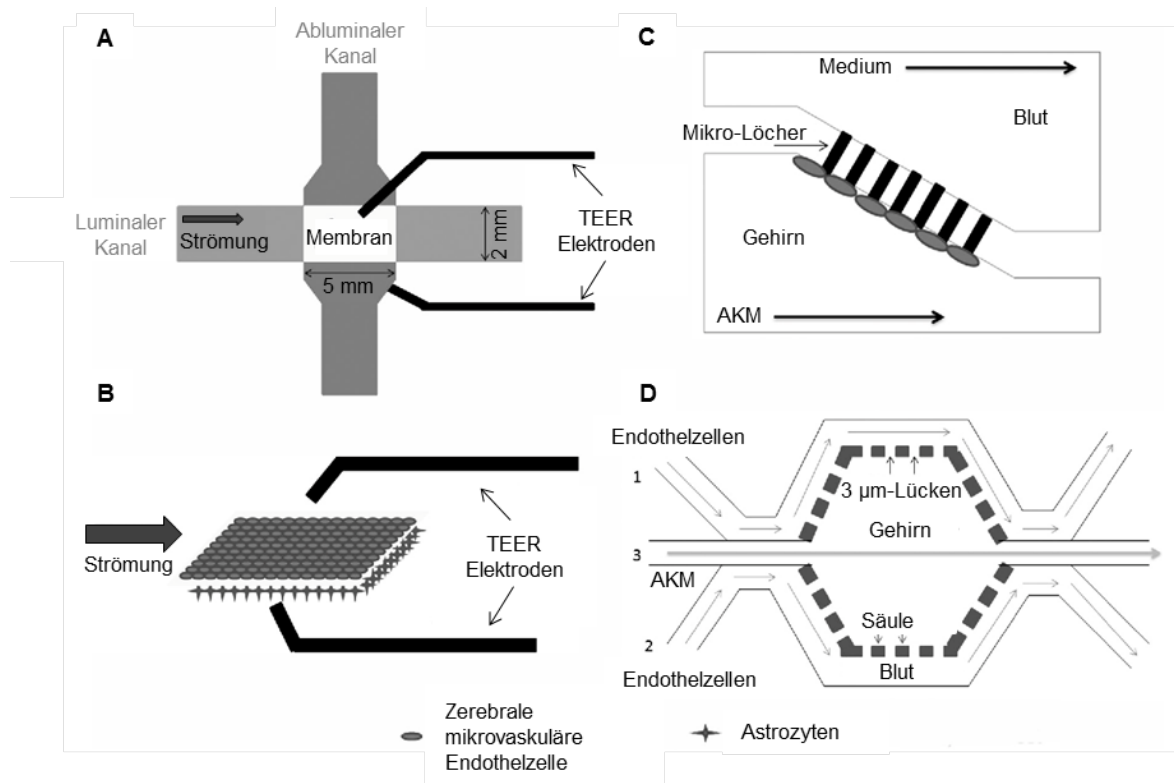


Abbildung 5: Mikrofluidische *in-vitro*-Zellkulturmodelle der Blut-Hirn-Schranke: mikrofluidisches BHS-Modell µBBB (A), dreidimensionale Ansicht der porösen Membran am Schnittpunkt der Strömungskanäle im µBBB (B), mikrofluidisches paralleles Design mit Mikrolöchern (C), Weiterentwicklung des parallelen Designs mit abgeänderten zirkulären Kanälen (D); Abbildung modifiziert nach (He et al. 2014); AKM = Astrozyten-konditioniertes Medium

Innerhalb der letzten Jahre wurden verschiedene Designs, Zellinteraktionen und Materialien getestet und validiert. Eine Weiterentwicklung der konventionellen Transwell™-Modelle stellen die membranbasierten mikrofluidischen Modelle dar (Abbildung 5, A + B). Bei diesen ‚Sandwich‘-Strukturen sind der obere und untere Kanal durch eine poröse Membran voneinander getrennt (Maoz et al. 2018; Walter et al. 2016; Brown et al. 2015; Booth und Kim 2014). Häufig wird als Membranmaterial Polycarbonat mit Porendurchmessern von 0,2 bis 3,0 µm verwendet. Eine Überwachung des Zellwachstums wird durch die eingeschränkte Transparenz der

Membranen und die übereinander gelagerte Zellkonfiguration erschwert (Oddo et al. 2019). Alternative transparente Membranmaterialien, wie z. B. PTFE, sind diesbezüglich besser geeignet (Sellgren et al. 2015). Die membranbasierten mikrofluidischen Systeme haben den Vorteil, dass sie eine moderate Komplexität aufweisen und einen relativ hohen Durchsatz ermöglichen. Verglichen mit den physiologischen Eigenschaften der Basalmembran sind die verwendeten Membranen relativ dick, was die Zellinteraktionen beeinflusst. Im Idealfall sollte eine nachgebildete Basalmembran aus biokompatiblen Materialien hergestellt sein und eine Dicke von ungefähr 100 nm haben (Oddo et al. 2019; Tilling et al. 1998). Alternativ dazu gibt es ein Design, bei dem die Kanäle parallel angeordnet sind. Die herkömmliche Membran ist durch eine Mikrokanal-Membran ersetzt (Abbildung 5, C). Diese besteht aus PDMS-basierten Mikrosäulen mit einem Abstand von 3 μm (Prabhakarpanthian et al. 2013). Dasselbe parallele Design wurde mit abgeänderten zirkularen Kanälen als Ko-Kulturmodell mit Astrozyten (Deosarkar et al. 2015) und mit zerebralen Tumorzellen (Terrell-Hall et al. 2017) etabliert (Abbildung 5, D). Im Vergleich zu den membranbasierten Modellen erleichtert die parallele Kanalanordnung mit transparenten Materialien eine Echtzeit-Visualisierung. Nachteilig ist, dass die PDMS-basierten Barrieren relativ dick ($\sim 50 \mu\text{m}$) sind. Für die Nachbildung einer *in vivo*-ähnlichen Basalmembran kommen auch extrazelluläre Matrix (EZM)-basierte Modelle mit Kollagen-Gelen als physikalische Barriere zum Einsatz (Wevers et al. 2018; Adriani et al. 2017). Die EZM muss eine ausreichende Festigkeit aufweisen, damit jede Zelle in ihrem Kompartiment gehalten werden kann. Schwierigkeiten gibt es vor allem bei der Durchführung von Permeabilitätsuntersuchungen oder TEER-Analysen innerhalb solcher Systeme (van der Helm et al. 2016a). Ein weiterer Kultivierungsansatz auf Kollagenbasis ist das 3D-Modell von Kim et al., in dem Mikronadeln in ein Kollagen I-Gel eingebettet wurden. Nach der Entfernung der Mikronadeln entstehen Kollagen-Röhren, in denen die Endothelzellen kultiviert werden können (Kim et al. 2015).

Neben den vorgegebenen Gefäßstrukturen ist die *de novo*-Rekonstruktion von Mikrogefäßen eine weitere Modellvariante. Die Endothelzellen bilden in Kollagen- oder Fibrin-Hydrogelen vaskuläre Netzwerke aus und knüpfen Kontakte zu anderen Zelltypen (Bang et al. 2017). Das Modell bietet gute Möglichkeiten, die dichte Barriere und die Interaktionen zwischen den zerebralen Zellen realitätsnah darzustellen.

Allerdings ist die Vaskulogenese oft ungleichmäßig, was die experimentelle Reproduzierbarkeit stark einschränkt und die Anwendungsmöglichkeiten begrenzt (Oddo et al. 2019).

Die mikrofluidischen Modellansätze zeigen hinsichtlich der Barrierefunktion und der Vorhersagbarkeit in Permeationsstudien vielversprechende Verbesserungen im Vergleich zu herkömmlichen Transwell™-Modellen (van der Helm et al. 2016a). Hieraus ergeben sich allerdings auch neue Herausforderungen, da die Prozesse noch nicht standardisiert sind und sich nur schwer auf bestehende Protokolle übertragen lassen (Halldorsson et al. 2015). Das hohe Anforderungsprofil führt zu einer zunehmenden Komplexität der Systeme sowohl in der Fertigung als auch in der Anwendung. Das macht das Handling oft anspruchsvoll und zeitintensiv. Bei Transport- und Permeationsstudien sollte darauf geachtet werden, dass die Konzentrationen der zu untersuchenden Substanzen nicht unter der Detektionsgrenze liegen. Trotz der erheblichen Fortschritte in den letzten Jahren hat sich noch kein dynamisches *in vitro*-Blut-Hirn-Schranke-Modell etabliert, das alle Anforderungen abdecken kann. Häufig liegt daher der Fokus auf der Verbesserung und Optimierung bereits vorhandener Modelle (Kara et al. 2017).

2.3.3 Zellkultivierung zerebraler Kapillarendothelzellen

Im Allgemeinen basieren *in vitro*-Zellkulturmodelle auf primären Zellen, Stammzellen oder immortalisierten Zellkulturen. Primäre BCECs werden aus Gehirnapillaren durch mechanische oder enzymatische Dispergierung isoliert und anschließend als adhärenente Monoschicht in Kultur gehalten (Freshney 2010). Die erste Isolierung von BCECs wurde mit Rattengehirnen durchgeführt (Panula et al. 1978). Bis heute sind viele unterschiedliche Isolationsmethoden aus Gehirnen verschiedener Spezies wie z. B. Rind (Cecchelli et al. 1999; Rubin et al. 1991), Schwein (Nielsen et al. 2017), Maus (Wu et al. 2003), Hund (Gerhart et al. 1988) oder gelegentlich Mensch (Dorovini-Zis et al. 2003; Biegel et al. 1995) als Ausgangsmaterial beschrieben worden. Primäre BCECs weisen in den frühen Passagen viele Merkmale der Blut-Hirn-Schranke *in vivo* auf. Insbesondere primäre bovine und porcine BCECs haben sich aufgrund ihrer guten Barriereigenschaften mit TEER-Werten von 500 bis über

$1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ als geeignet herausgestellt (Helms et al. 2016; Patabendige et al. 2013a; Deli et al. 2005; Cecchelli et al. 1999). Allgemein hat die Verwendung von Schweine- und Rindergehirnen den Vorteil, dass diese einfach zu beschaffen sind und eine große Zellausbeute generieren. Im Unterschied dazu stammt humanes Gehirngewebe aus Biopsien und steht daher nur in geringen Mengen zur Verfügung (Lippmann et al. 2012; Dorovini-Zis et al. 2003). Außerdem besteht dieses Gewebe häufig aus krankhaft veränderten Zellen, wie z. B. Tumorzellen, bei denen möglicherweise andere Zelleigenschaften vorliegen. Rubin et al. isolierten primäre humane BCECs nach einer Gehirnbiose und erreichten maximale TEER-Werte von $339 \pm 107 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Rubin et al. 1991). Bei der Isolierung primärer Nagetierzellen wird aufgrund des geringen Gehirnvolumens relativ viel Ausgangsmaterial benötigt. Trotz der geringen Ausbeuten finden Nagetiermodelle eine vielseitige Anwendung (Deli et al. 2005). Das liegt vor allem an der guten Verfügbarkeit, der umfangreichen Charakterisierung und der guten Korrelation zu *in vivo*-Daten (Wilhelm und Krizbai 2014). Die Nagetiermodelle weisen in Mono-Kultur TEER-Werte von 100 bis $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Helms et al. 2016) auf. Ein deutlicher TEER-Anstieg auf über $600 \Omega \cdot \text{cm}^2$ wurde bei einem Ko-Kulturmodell mit Gliazellen ermittelt (Watson et al. 2013).

Trotz der ähnlichen Eigenschaften zu den *in vivo*-Endothelzellen ist die Anwendbarkeit von Primärzellen aufgrund einiger Nachteile begrenzt. Zum einen gibt es neben den ethischen Bedenken viele speziesspezifische Unterschiede bei der Genexpression von TJ-Proteinen, Transportern oder Rezeptoren (Aday et al. 2016; Hoshi et al. 2013; Warren et al. 2009). Zum anderen kommt es mit zunehmender Passagenzahl in Kultur zu einer Veränderung des Phänotyps und zu einem Verlust der Barriereigenschaften. Des Weiteren ist der Isolationsprozess zeit- und kostenintensiv und die Handhabung der Zellen relativ anspruchsvoll. Weitere Herausforderungen sind die biologischen Variabilitäten in Abhängigkeit des ursprünglichen Gewebes und der Isolationsmethode sowie die Gefahr von Kontaminationen durch andere Zelltypen, die zu einer uneinheitlichen Endothelzell-Monoschicht führen können (Helms et al. 2016).

Eine Alternative zur Verwendung von Primärzellen sind Stammzellen, deren Erforschung in den letzten zehn Jahren große Fortschritte gemacht hat (Aday et al. 2016). Stammzellen haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und können sich

gezielt in gewebespezifische Zelltypen differenzieren (Lippmann et al. 2012). Pluripotente Stammzellen (*pluripotent stem cells*, PSCs) können sich in jegliches Gewebe weiterentwickeln. Zu ihnen zählen embryonale Stammzellen (*embryonal stem cells*, ESCs), die aus der inneren Zellmasse von Blastozyten gewonnen werden (Thomson et al. 1998), und induzierte pluripotente Stammzellen (*induced pluripotent stem cells*, iPSCs), die durch eine Reprogrammierung somatischer Zellen pluripotente Eigenschaften erlangen (Yu et al. 2007; Takahashi et al. 2007). Die Verwendung von iPSCs ist aus ethischer und rechtlicher Sicht weniger problematisch als die von ESCs. Multipotente Stammzellen und Progenitorzellen aus adultem Gewebe können hingegen nur in bestimmte, festgelegte Gewebstypen differenzieren.

Ein humanes Blut-Hirn-Schranke-Modell wurde durch die Verwendung von hämatopoetischen Progenitorzellen gewonnen und erreichte einen TEER von ungefähr $60 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Cecchelli et al. 2014). Ein alternatives Modell mit humanen Endothelzellen wurde von Lippmann et al. durch ein mehrstufiges Differenzierungsprotokoll aus neuronalen Progenitorzellen entwickelt (Lippmann et al. 2013). Die differenzierten Endothelzellen wiesen in Mono-Kultur einen TEER von $222 \pm 51 \Omega \cdot \text{cm}^2$ und in Ko-Kultur mit Astrozyten einen TEER von $1450 \pm 140 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf. Eine Zugabe von Retinsäure förderte in humanen PSC-abgeleiteten BCECs die Expression von VE-Cadherin sowie Occludin und generierte in Ko-Kultur TEER-Werte von ungefähr $5000 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Lippmann et al. 2014). Des Weiteren wurden iPSCs verwendet, um den Einfluss von Scherspannungen auf die Zellen zu untersuchen (DeStefano et al. 2017) und um ein humanes Quadrupel-Modell aus Endothelzellen, Astrozyten, Perizyten und neuronalen Progenitorzellen mit TEER-Werten bis zu $2500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ aufzubauen (Appelt-Menzel et al. 2017).

Für die Verwendung pluripotenter Stammzellen spricht, dass sie sich in alle Arten von somatischen Zellen mit *in vivo*-ähnlichen Zelleigenschaften differenzieren lassen (Helms et al. 2016). So kann möglicherweise zukünftig mit patientenspezifischen Zellkulturmodellen gearbeitet werden. Nachteilig sind die meist langwierigen Differenzierungsprotokolle und komplexen Arbeitsschritte. Abhängig vom Zellursprung der iPSCs kann es zu Unterschieden in den molekularen und funktionellen Eigenschaften kommen, erkennbar z. B. an TEER-Schwankungen (Appelt-Menzel et al. 2017; Aday et al. 2016; Nukaya et al. 2015).

Am weitesten verbreitet ist die Verwendung von immortalisierten Zelllinien (Rahman et al. 2016). Diese werden entweder aus Tumorgewebe gewonnen oder durch die Überexpression von viralen Onkogenen bzw. durch spontane Mutagenese gebildet. Im Unterschied zu isolierten Primärzellen besitzen sie den Vorteil, sich über längere Zeiträume ohne wesentliche Veränderungen kultivieren zu lassen. Außerdem sind sie einfach zu handhaben, ermöglichen einen hohen Durchsatz, haben gute Reproduzierbarkeiten und ihre Kultivierung ist weniger zeit- und kostenintensiv als die von Primär- und Stammzellen (Daniels et al. 2013). Bei der Etablierung von *in vitro*-Modellen werden neben Gehirndothelzelllinien auch nicht-zerebrale Zelllinien eingesetzt. Aufgrund ihrer dichten parazellulären Barriere kommen bei diesen sogenannten Ersatzmodellen Epithelzelllinien, wie z. B. die MDCK (*Madin Darby canine kidney*) Zelllinie oder die humane Caco-2 (*human colonic adenocarcinoma-2*) Zelllinie zum Einsatz (Hellinger et al. 2012). Auch wenn die passive Diffusion von Substanzen bei der Verwendung von Ersatzmodellen zum Teil gut mit der Diffusion durch die Blut-Hirn-Schranke korreliert, treten zum Teil erhebliche Unterschiede in der Protein- und Transporter-Expression auf (Veszeka et al. 2018; Avdeef et al. 2015). So exprimiert die MDCK-Zelllinie hauptsächlich die TJ-Proteine Claudin-1 sowie Claudin-4 und weniger das Blut-Hirn-Schranke-typische TJ-Protein Claudin-5 (Veszeka et al. 2018; Wang et al. 2005). Ein weiterer Unterschied liegt bei der Expression von Efflux-Transportern. Um die Anwendbarkeit von MDCK Zellen in Efflux-Transportstudien zu verbessern, wurde die Zelllinie mit dem MDR1-Gen transfiziert und so eine Überexpression von P-gp bewirkt (Gartzke und Fricker 2014).

Unter den zerebralen Endothelzelllinien sind die murinen Endothelzelllinien bEND.3/5 und MBEC-4 (Watanabe et al. 2013) sowie die Zelllinien RBE4 und GP8 aus der Ratte (Roux und Couraud 2005) weit verbreitet. Da sehr gute primäre Rinder- und Schweinemodelle zur Verfügung stehen, haben immortalisierte bovine und porcine Zelllinien, wie tBBEC-11749 und PBMEC/C1-2.153, nur geringe Bedeutung (Kara et al. 2017). Die Identifizierung von speziesspezifischen Unterschieden belegte die eingeschränkte Anwendbarkeit einiger tierischer Zelllinien (Hoshi et al. 2013; Warren et al. 2009). So wurde in humanen zerebralen Endothelzellen eine geringere BCRP-Expression festgestellt als in den Endothelzellen von Mäusen, Ratten, Schweinen oder Rindern (Warren et al. 2009). Als Konsequenz werden zunehmend

humane Endothelzelllinien für die Etablierung von Blut-Hirn-Schranke-Modellen eingesetzt. Beispiele für humane zerebrale Endothelzelllinien sind hCMEC/D3 (Weksler et al. 2005), NKMI-6 (Ketabi-Kiyanvash et al. 2007), BB19 (Prudhomme et al. 1996), SV-HCEC (A. Muruganandam, 1997), TY10 (Sano et al. 2010) und hBMEC (Eigenmann et al. 2016; Stins et al. 2001). Eigenmann et al. verglichen die BB19, TY10, hBMEC und hCMEC/D3 Zelllinien miteinander und identifizierten die hBMEC Zelllinien aufgrund der besseren Permeabilitätswerte von Luzifergelb und Natrium-fluoreszein als die am besten geeignete Zelllinie für ein humanes *in vitro*-Modell (Eigenmann et al. 2013).

Im Vergleich dazu ist die hCMEC/D3 Zelllinie in der Literatur besser charakterisiert (Rahman et al. 2016; Helms et al. 2016). Sie exprimiert *Junction*-assoziierte IgG-ähnliche Proteine wie JAM-A und PECAM-1 (*platelet-endothelial cell adhesion molecule-1*), AJ- und TJ-Proteine wie VE-Cadherin, Claudin-3/-5 und Occludin, Gerüstproteine wie β -Catenin, ZO-1 und ZO-2 sowie verschiedene Endothelmarker wie den von-Willebrand-Faktor (vWF) (Helms et al. 2016; Weksler et al. 2013). Außerdem wurden zahlreiche SLC-Transporter, darunter SLC2A1 (Glut-1) und SLC7A5 (LAT-1) und ABC-Efflux-Transporter, darunter P-gp, MRP-4 und BCRP nachgewiesen (Ohtsuki et al. 2013; Lopez-Ramirez et al. 2013; Poller et al. 2010; Carl et al. 2010). Die Expression von P-gp der hCMEC/D3 Zellen ist denen der humanen BCECs ähnlich (Tai et al. 2009). Die hCMEC/D3 Zelllinie wird u. a. für Absorptions-, Transport-, Entzündungs- und Immunstudien sowie für die Untersuchung von Krankheitserregern, dynamischen Kultivierungsbedingungen und interzellulären Wechselwirkungen eingesetzt (Weksler et al. 2013).

Ein großer Nachteil aller Zelllinien sind die stark veränderten Eigenschaften, wie z. B. eine inhomogene TJ-Expression und eine geringe parazelluläre Dichtigkeit. Deutlich erkennbar wird das an den TEER-Werten, die mehrheitlich mit 10 bis 300 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ unter denen der Primärzellen liegen. Es existieren viele immortalisierte Endothelzelllinien unterschiedlichen Ursprungs, aber keine repräsentiert vollständig die gewünschte Funktionalität der Blut-Hirn-Schranke (Kaisar et al. 2017). Im Hinblick auf eine einfache, kostengünstige Anwendung mit einem hohen Durchsatz für Arzneimittelabsorptionsstudien wird die Verwendung von immortalisierten Zelllinien weiterhin als sinnvoll erachtet.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Der folgende Abschnitt ist in die Unterkategorien Antikörper, Primer und Templates, Substanzen, Kits, Verbrauchsmaterialien, Laborgeräte und Software sowie dynamisches Zellkulturmodell unterteilt. Sofern nicht anders angegeben handelt es sich bei den Prozentangaben um die Massenkonzentration (m/V).

3.1.1 Antikörper

Tabelle 1: Übersicht über die Antikörper, die für die Immunfluoreszenzfärbungen eingesetzt wurden

Antikörperbezeichnung	Spezies	Verdünnung	Herstellerangaben
Primärer Antikörper			
Anti-Claudin-5, 0,2 mg/ml	Kaninchen	1:40	Abcam (GBR-Cambridge)
Anti-Occludin, 1,0 mg/ml	Kaninchen	1:500	Abcam (GBR-Cambridge)
Anti-VE Cadherin, 1,0 mg/ml	Kaninchen	1:200	Abcam (GBR-Cambridge)
Anti-von-Willebrand-Faktor, 8,6 mg/ml	Kaninchen	1:400	Abcam (GBR-Cambridge)
Anti-ZO-1 TJ Protein, 0,1 mg/ml	Kaninchen	1:100	Abcam (GBR-Cambridge)
Sekundärer Antikörper			
Anti-Rabbit IgG H&L (FITC)	Ziege	1:200	Abcam (GBR-Cambridge)

3.1.2 Primer und Templates

Tabelle 2: Übersicht über die Primer und Templates, die für die qRT-PCR-Untersuchungen verwendet wurden

Primer und Templates	Effizienz [%]	Herstellerangaben
PrimePCR™ SYBR® Green ACTB, human	103	Bio-Rad Laboratories (DE-München)
PrimePCR™ SYBR® Green CDH5, Human	104	Bio-Rad Laboratories (DE-München)
PrimePCR™ SYBR® Green CLDN5, human	102	Bio-Rad Laboratories (DE-München)
PrimePCR™ SYBR® Green GAPDH, human	97	Bio-Rad Laboratories (DE-München)
PrimePCR™ SYBR® Green OCLN, human	90	Bio-Rad Laboratories (DE-München)
PrimePCR™ SYBR® Green TJP1, human	94	Bio-Rad Laboratories (DE-München)
PrimePCR™ Template CLDN5	-	Bio-Rad Laboratories (DE-München)
PrimePCR™ Template TJP1	-	Bio-Rad Laboratories (DE-München)

3.1.3 Substanzen

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Substanzen

Substanzen	Herstellerangaben
2-Propanol	CVH Chemie-Vertrieb (DE-Hannover)
Calciumchlorid Hexahydrat	Carl Roth (DE-Karlsruhe)
Chloroform	Thermo Fisher Scientific (US-Waltham)
Collagen Typ IV, human, 1 mg/mL in 0,5 M Essigsäure	Merck (DE-Darmstadt)
Collagen G (Typ I), 4 mg/ml in 15 mM HCl	Biochrom (DE-Berlin)
Coulter Clenz® Cleaning agent	Beckman Coulter (DE-Krefeld)
D-Glucose Monohydrat	Carl Roth (DE-Karlsruhe)
Diethylpyrocarbonat-behandeltes Wasser, RNase-frei	Thermo Fisher Scientific (US-Waltham)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Thermo Fisher Scientific (US-Waltham)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), flüssig	Merck (DE-Darmstadt)
Dulbecco's MEM/Ham's F-12 Medium (1:1), flüssig	Merck (DE-Darmstadt)
eBioscience™ Calcein AM	Thermo Fisher Scientific (US-Waltham)
EDTA-Dinatriumsalz-Lösung, 2 % in PBS	MP Biomedicals (US-Solon)
Endothelial basal medium-2 (EBM™-2)	Lonza (CH-Basel)
Endothelial cell basal medium MV2	Promocell (DE-Heidelberg)
Eosin G-Lösung, 0,5 % in H ₂ O	Merck (DE-Darmstadt)
Ethanol absolut, ≥ 99,5 % (V/V)	Carl Roth (DE-Karlsruhe)
Eukitt®	O.Kindler (DE-Bobingen)
FastRuler™ low range DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific (US-Waltham)
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom (DE-Berlin)
Fibroblast growth factor-basic, human (bFGF)	Sigma-Aldrich Chemie (DE-Taufkirchen)
Fibronectin, human, 1 mg/ml in PBS	Merck (DE-Darmstadt)
FITC-Dextran, 4 kDa (4000 g/ml)	Sigma-Aldrich (DE-München)
FluorSave™ Reagent	Merck (DE-Darmstadt)
Gelatine reinst, Ph. Eur.	SERVA Electrophoresis (DE-Heidelberg)
Gentamicinsulfat, 10 mg/ml in H ₂ O	Merck (DE-Darmstadt)
Gibco™ Antibiotika/Antimykotika-Lösung, 10.000 Units/ml Penicillin, 10.000 µg/ml Streptomycin, 25 µg/ml Amphotericin B	Thermo Fisher Scientific (US-Waltham)
Gibco™ CO ₂ -independent medium	Thermo Fisher Scientific (US-Waltham)
Gibco™ MCDB 131 Medium	Thermo Fisher Scientific (US-Waltham)
Gibco™ Trypsin 0,5 g/L - EDTA 0,2 g/L in HBSS	Thermo Fisher Scientific (US-Waltham)
Ham's F-12 Medium, flüssig	Merck (DE-Darmstadt)
HEPES Puffer	Biochrom (DE-Berlin)

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Substanzen

Substanzen	Herstellerangaben
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich (DE-Taufkirchen)
Human endothelial serum-free medium (hESFM)	Thermo Fisher Scientific (US-Waltham)
Hydrocortison, 1 mg/ml in Ethanol	Biochrom (DE-Berlin)
Invitrogen™ TRIzol™ reagent	Thermo Fisher Scientific (US-Waltham)
Kaliumchlorid	Thermo Fisher Scientific (BE-Geel)
Kollagen G (Kollagen Typ I)	Sigma-Aldrich (DE-Taufkirchen)
Laminin, human, 0,5 mg/mL in Tris-gepufferte NaCl-Lsg.	Merck (DE-Darmstadt)
L-Glutamin, 200 mM	Merck (DE-Darmstadt)
Magnesiumsulfat Heptahydrat	Thermo Fisher Scientific (BE-Geel)
Matrigel™-Lösung, 9,1 mg/ml	BD Bioscience (DE-Heidelberg)
Medium 199 (M199), flüssig	Biochrom (DE-Berlin)
MEM non-essential amino acids solution (NEAA), 100X	Thermo Fisher Scientific (US-Waltham)
MEM-Vitamin Lösung, 100X	Biochrom (DE-Berlin)
Mimimal Essential Medium (MEM) mit 2,2 g/l NaHCO ₃	Biochrom (DE-Berlin)
MTT (Methylthiazolyldiphenyltetrazoliumbromid)	Merck (DE-Darmstadt)
Mycoplasma Removal Agent	MP Biomedicals (US-Solon)
Natriumchlorid	Merck (DE-Darmstadt)
O'RangeRuler™ 20 bp DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific (US-Waltham)
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich (DE-Taufkirchen)
pCPT-cAMP	Sigma-Aldrich (DE-Taufkirchen)
Phosphate buffered saline (PBS) Dulbecco-Lösung, calcium- und magnesiumfrei, pH 7,4	Sigma-Aldrich (DE-Taufkirchen)
Polysorbat 20 (Tween® 20)	Carl Roth (DE-Karlsruhe)
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich (DE-Hamburg)
Rinderserumalbumin (BSA)	Carl Roth (DE-Karlsruhe)
RNase™ AWAY zur Oberflächendekontamination	Fisher Scientific (DE-Schwerte)
Ro-20-1724 (Phosphodiesteraseinhibitor)	Merck (DE-Darmstadt)
ROTI®CALIPURE pH-Pufferlösungen, pH 4,0, 7,0, 9,0	Carl Roth (DE-Karlsruhe)
Roti®-Histofix 4 % (Formaldehyd)	Carl Roth (DE-Karlsruhe)
RPMI 1640 mit 2,0 g/l NaHCO ₃ , flüssig	Merck (DE-Darmstadt)
Saccharose	Sigma-Aldrich (DE-Taufkirchen)
Serum-free endothelial cell medium (SF ECM)	Cell Biologics (US-Chicago)
Technovit® 3040	Heraeus Kulzer (DE-Wehrheim)
Technovit® 7100	Heraeus Kulzer (DE-Wehrheim)
TRIS HCl	Sigma-Aldrich (DE-Taufkirchen)
Triton X-100	Fisher Scientific (FIN-Vantaa)

3 Material und Methoden

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Substanzen

Substanzen	Herstellerangaben
Trypanblau-Lösung, 4 g/l in H ₂ O	Sigma-Aldrich (DE- Taufkirchen)
Trypsin 2,5 g/l - EDTA 0,2 g/l in PBS	Merck (DE-Darmstadt)
Ziegenserum (normal goat serum, NGS)	Vector Laboratories (US-Burlingame)

3.1.4 Kits

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Kits

Kit	Herstellerangaben
Cellviability ReagentKit®	Beckman Coulter (DE-Krefeld)
Endothelial cell growth medium (ECGM) MV2 Kit	Promocell (DE-Heidelberg)
iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories (DE-München)
Microvascular endothelial cell growth medium-2	Lonza (CH-Basel)
BulletKit™ (EGM™-2 MV vereinfacht zu EGM-2)	
Microvascular endothelial SingleQuots™ Kit	Lonza (CH-Basel)
Mycoplasma Test Kit	Promocell (DE-Heidelberg)
SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix	Bio-Rad Laboratories (DE-München)

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Zusammenstellung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchs- und Labormaterialien	Herstellerangaben
Costar™ Zellkulturplatten, 6- und 12-Well	Corning Costar (US-Kennebunk)
CryoPure® Einfriergefäß	Sarstedt (DE-Nümbrecht)
Deckgläser	Carl Roth (DE-Karlsruhe)
Eppendorf Pipetten, 10, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf (DE-Hamburg)
Hamilton™ Mikroliter-Spritze, 200 µl	Fisher Scientific (DE-Schwerte)
Hard-Shell® 96-Well PCR-Platten, weiß/transparent	Bio-Rad Laboratories (DE-München)
MicroWell™-Zellkulturplatte, 96-Well, schwarz & weiß	Fisher Scientific (DE-Schwerte)
Nalgene™ Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific (US-Waltham)
Nitrilhandschuhe	VWR (DE-Darmstadt)
Objektträger	Carl Roth (DE-Karlsruhe)
Pasteurpipetten	Carl Roth (DE-Karlsruhe)
PCR-Verschlussfolie für 96-Well, klebend, optisch klar	Bio-Rad Laboratories (DE-München)

Tabelle 5: Zusammenstellung der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Verbrauchs- und Labormaterialien	Herstellerangaben
Pipettenspitzen Biosphere® Filter für PCR, 0,1-20, 100 µl	Sarstedt (DE-Nümbrecht)
Pipettenspitzen Standard, 10, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf (DE-Hamburg)
Reaktionsgefäß Multiply®-Pro für PCR, 0,2 ml	Sarstedt (DE-Nümbrecht)
Reaktionsgefäße Multi® Safe Seal, 0,5, 1,0, 1,5 ml	Carl Roth (DE-Karlsruhe)
Reaktionsgefäße SafeSeal für PCR, 1,5 ml	Sarstedt (DE-Nümbrecht)
Rotilabo™ Reaktionsgefäß, schwarz	Carl Roth (DE-Karlsruhe)
Serologische Pipette, 2, 5, 10, 25 ml	Sarstedt (DE-Nümbrecht)
Skalpell Cutfix®	B. Braun (DE-Melsungen)
Spritzen, 2, 5, 10, 50 ml	B. Braun (DE-Melsungen)
Tefloneinbettform Histoform S	Heraeus Kulzer (DE-Wehrheim)
Trägerteil Histobloc®	Heraeus Kulzer (DE-Wehrheim)
Zellkultureinsätze ThinCerts™, 0,4 µm, PET, 12 mm	Greiner Bio One (DE-Bad Nenndorf)
Zellkultureinsätze Transwell™, 0,4 µm, PET, 12 mm	Corning Costar (US-Kennbunk)
Zellkulturflasche, 115 cm ² , mit verschließbarem Deckel	TPP (CH-Trasadingen)
Zellkulturflaschen, 25, 75 cm ²	Sarstedt (DE-Nümbrecht)
Zellkulturkammern, 8-Well	Sarstedt (DE-Nümbrecht)
Zellkulturtestplatte, 24- und 96-Well	TPP (CH-Trasadingen)
Zellschaber S	TPP (CH-Trasadingen)
Zentrifugenröhrchen, 15, 50 ml	Sarstedt (DE-Nümbrecht)
Zentrifugenröhrchen, 250 ml	Corning Costar (US-Kennbunk)

3.1.6 Laborgeräte und Software

Tabelle 6: Übersicht über die Laborgeräte und ggf. die dazugehörige Software

Laborgeräte und Software	Herstellerangaben
Allegra 64R Zentrifuge	Beckman Coulter (DE-Krefeld)
Analysenwaagen Quintix®	Sartorius (DE-Göttingen)
AutoklavDX23 und VX150	Systec GmbH (DE-Linden)
CFX96 (RT-PCR) und BioRad CFX Manager Software	Bio-Rad Laboratories (DE-München)
Coulter-Counter Z2	Beckman Coulter (DE-Krefeld)
EBA 200 Zentrifuge	Hettich (DE-Tuttligen)
Endohm-12 Chamber®	WPI (US-Sarasota)
Eppendorf® Pipette Reference 2, 10, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf (DE-Hamburg)
EVOM ² ® Meter	WPI (US-Sarasota)

3 Material und Methoden

Tabelle 6: Übersicht über die Laborgeräte und ggf. die dazugehörige Software

Laborgeräte und Software	Herstellerangaben
Fluoreszenzmikroplattenleser GENios	Tecan (CH-Männedorf)
Gen5™ Software	BioTek (DE-Bad Friedrichshall)
Infrarot-Thermometer	Medisana AG (DE-Neuss)
ISM597 Peristaltikpumpe	Ismatec (DE-Wertheim)
KDS 270 Legacy Spritzenpumpe	KD Scientific (US-Holliston)
Kleinschüttler IKA® MS 3 digital	IKA®-Werke (DE-Staufen)
Locator JR Plus	Thermo Fisher Scientific (US-Waltham)
Magallan™ Software	Tecan (CH-Männedorf)
Mikrotom HM 355s	Thermo Fisher Scientific (US-Waltham)
NanoDrop-Spektrometer SimpliNano™	Biochrom (DE-Berlin)
Olympus XC 30 Kamera	Olympus (DE-Hamburg)
OriginPro 9G Software	OriginLab (US-Northampton)
Phasenkontrastmikroskop Olympus IX50 (invers)	Olympus (DE-Hamburg)
pH-Meter FiveEasy Plus®	Mettler Toledo GmbH (DE-Gießen)
Pipetierhilfe Pipetus®	Hirschmann-Laborgeräte (DE-Eberstadt)
PowerWave XS Mikroplattenleser mit der Präzisionswaagen Quintix®	BioTek (DE-Bad Friedrichshall) Sartorius (DE-Göttingen)
Qik Spin Zentrifuge	Süd-Laborbedarf (DE-Gauting)
Sicherheitswerkbank der Klasse II	Fisher Scientific (DE-Schwerte)
Sterilisator SF110	Memmert GmbH (DE-Schwabach)
STX2® Chopstick Electrode	WPI (US-Sarasota)
Thermo Scientific™ LN2-Vorratstanks	Fisher Scientific (DE-Schwerte)
Tischinkubator	Heraeus Kulzer (DE-Wehrheim)
ViCell® Analyzer	Beckman Coulter (DE-Krefeld)
Zellkulturinkubator	Thermo Fisher Scientific (US-Waltham)

3.1.7 Dynamisches Zellkulturmodell

Das Zellkulturmodell DynaMiTES (Abbildung 6) entstand im Zuge eines interdisziplinären Projekts mit dem Institut für Mikrotechnik der TU Braunschweig. Es wurde ursprünglich als *in vitro*-Zellkulturmodell für dynamische Arzneimittelabsorptionsstudien durch die Kornea konzipiert (Beißner et al. 2018; Mattern et al. 2018). Die Integration von konventionellen Zellkultureinsätzen in das System ermöglicht einen vielseitigen Einsatz, z. B. als *in vitro*-Blut-Hirn-Schranke-Modell. In den folgenden Abschnitten werden der Aufbau, der Entwicklungsverlauf und die verwendeten Materialien erläutert.

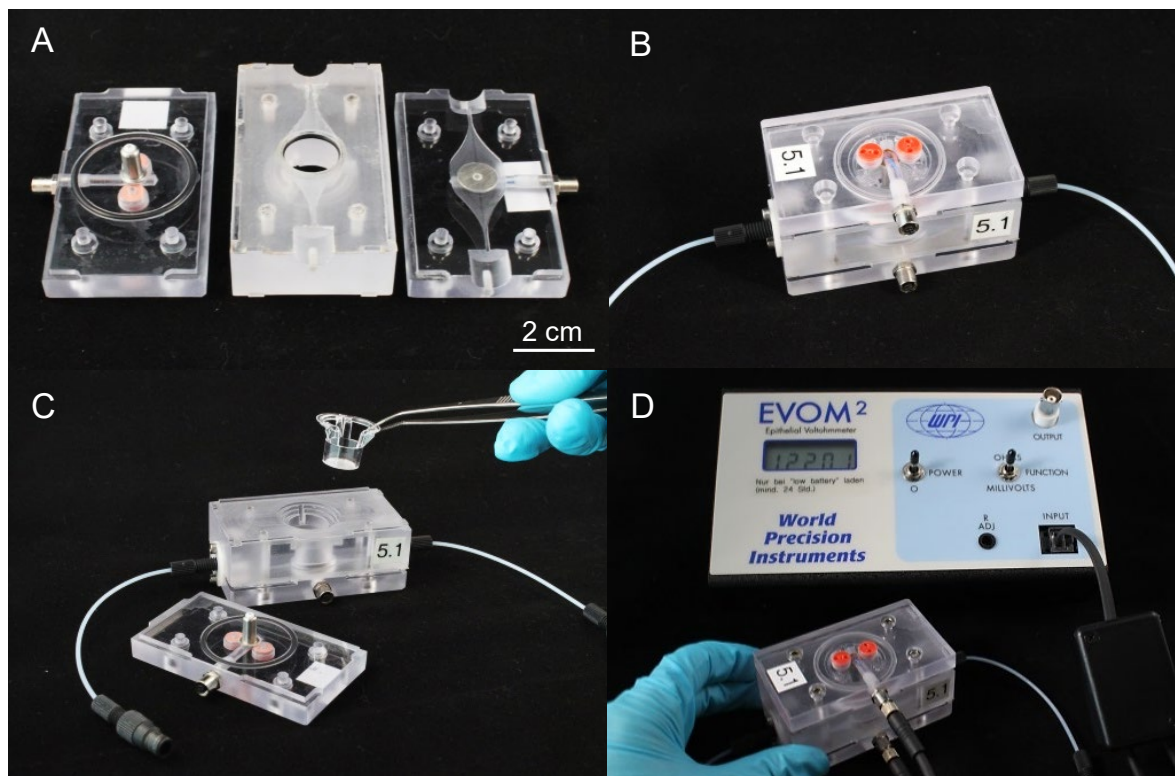


Abbildung 6: Dynamisches Zellkulturmodell DynaMiTES: auseinandergebaut in die obere, mittlere und untere Ebene (A), zusammengebaut (B), Einsetzen eines beispielhaften Zellkultureinsatzes in das DynaMiTES (C) und exemplarische TEER-Messung im DynaMiTES mit Hilfe des EVOM²® Meters (D)

Der Grundkörper des DynaMiTES besteht aus dem Material Polycarbonat, das im Vergleich zu dem häufig verwendeten PDMS chemisch inert ist. Darüber hinaus erfüllt es weitere Anforderungen, wie z. B. Robustheit, Transparenz und Zellverträglichkeit (Mattern et al. 2018). Das System gliedert sich in die obere, mittlere und untere Ebene. In der mittleren Ebene befindet sich der Zellkultureinsatz, der das Akzeptorkompartiment mit einem Volumen von 1,4 ml darstellt. Durch die Probenlöcher in

der oberen Ebene, die mit PTFE-beschichteten Silizium-Septa verschlossen sind, kann mit Hilfe von Mikroliter-Spritzen eine Probe entnommen werden. Das Akzeptor-Kompartiment ist durch einen Dichtungsring aus Ethylen-Propylen-Dien-Monomer (EPDM)-Kautschuk gegen die untere Ebene, dem Donor-Kompartiment, hin abgedichtet. Dieses Donor-Kompartiment fasst ein Volumen von 0,37 ml. Die Volumina der beiden DynaMiTES-Kompartimente sind vergleichbar mit denen von statischen Transwell™-Modellen (1,5 und 0,5 ml). Das Akzeptor- und Donor-Kompartiment im dynamischen System sind im Vergleich zu den Kompartimenten der herkömmlichen 12-Well-Zellkultursysteme entgegengesetzt ausgerichtet. Um den Fluss des Mediums entlang des Zellmonolayers weiterhin zu gewährleisten, werden die Zellen auf der Membranunterseite der Zellkultureinsätze kultiviert. Informationen über die Zellaussaat sind in Abschnitt 3.2.8.1 zu finden. Der Kanal im DynaMiTES hat einen rechteckigen Querschnitt mit einer Höhe von 1 mm und einer Breite von 15 mm. Mit Hilfe einer Schlauch- bzw. Spritzenpumpe wurde im DynaMiTES eine laminare Strömung erzeugt. Charakteristisch ist hierbei ein parabolisches Strömungsprofil, bei dem die Fließgeschwindigkeit des Mediums in der Kanalmitte am höchsten und damit einhergehend dort die Scherkraft entlang der Strömungsrichtung am größten ist. Die strömungsinduzierte Scherspannung auf die Zellen in einem rechteckigen Mikrokanal ($w \gg h$) unter Verwendung einer Newtonschen Flüssigkeit kann wie folgt berechnet werden (van der Helm et al. 2016a):

$$\tau = \frac{6\eta \cdot Q}{A \cdot h} \quad \text{Gleichung 3.1}$$

τ [Pa] = Scherspannung

η [Pa · s] = Viskosität

Q [m³ · s⁻¹] = Volumenfluss

A [m²] = Fläche

h [m] = Höhe

Des Weiteren kann im DynaMiTES die Barriereintegrität der Zellen über den gesamten Versuchszeitraum mittels kontinuierlicher TEER-Messung durch die integrierten Elektroden kontrolliert werden.

3.1.7.1 Entwicklungsverlauf der DynaMiTES-Prototypen

Die ersten DynaMiTES-Prototypen wiesen eine Länge von 7,3 cm und eine Breite von 3,9 cm auf. Die Ebenen waren über zwei Zentrierstifte aus Metall miteinander verbunden und in der oberen und unteren Ebene befanden sich jeweils zwei konzentrische Edelstahl-Elektroden (Abbildung 7, A + B). Im weiteren Verlauf wurde das dynamische Zellkultursystem bis zum fünften Prototyp (Abbildung 6) von Kai Mattern in Zusammenarbeit mit Nicole Beißner und Sarah Hinkel weiterentwickelt, wobei die wichtigsten Geometrieparameter unverändert blieben, wie z. B. die Dichtringnut, das Akzeptor- und Donor-Kompartiment sowie die Kanalhöhe und der Kanalquerschnitt.

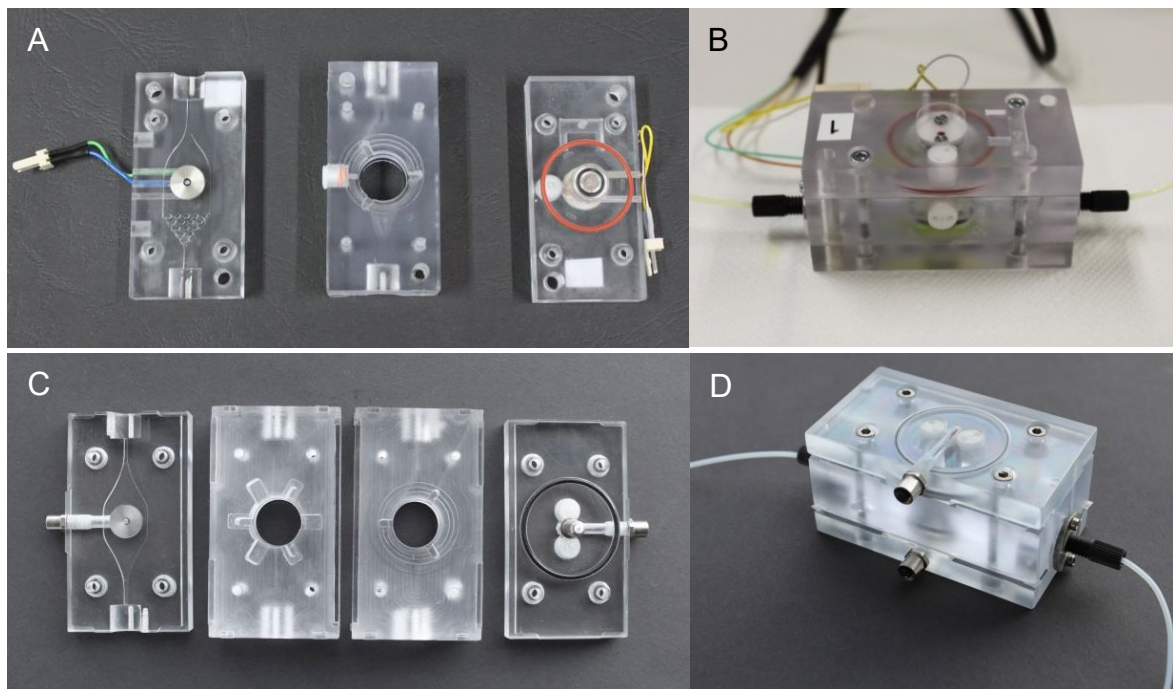


Abbildung 7: Der zweite (A, B) und vierte (C, D) DynaMiTES-Prototyp jeweils auseinander- und zusammengebaut; Foto (B) von (Beißner et al. 2018)

Die ursprünglich eingebauten Metallstifte neigten zur Korrosion und erschwerten das Auseinander- und Zusammenbauen des DynaMiTES. Aus diesem Grund wurden die Metallstifte durch eine Ausrichtungshilfe aus integrierten Schienen an den verschiedenen Ebenen ersetzt. Da bei geringen Flussraten keine verbesserte Durchmischung nachgewiesen werden konnte, wurde bei der Weiterentwicklung zum Prototyp 3 auf die mikrofluidische Homogenisierungsstruktur im Kanal verzichtet und nur die Außengeometrie beibehalten (Mattern et al. 2018). Die oberen

Elektroden bekamen eine stabförmige Elektrodengeometrie in Anlehnung an die Elektroden in der Endohm®-Kammer. Bei der Weiterentwicklung zum vierten Prototyp (Abbildung 7, C + D) wurde für die Anwendung von Greiner®-Zellkultureinsätzen (ThinCert™) eine alternative mittlere Ebene mit veränderter Einsatzgeometrie eingeführt. Der fünfte Prototyp wurde in einer größeren Stückzahl produziert. Bei diesem wurden zur Vermeidung von Korrosionen die Metallhülsen durch Hülsen aus Delrin ersetzt. Zusätzlich zu den herkömmlichen oberen und unteren Ebenen kamen elektrodenfreie und damit vollständig transparente Ebenen zum Einsatz. Sofern nicht anders angegeben wurden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit den fünften Prototypen erzielt.

3.1.7.2 DynaMiTES-Materialien

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Materialien bei den DynaMiTES-Versuchen; ID = Innendurchmesser

Material	Herstellerangaben
Adapter IDEX H&S P-660	IDEX Health & Science (DE-Erlangen)
Edelstahl (V2A bzw. V4A/1.4305)	Schnabel GmbH (DE-Braunschweig)
Flangeless Ferrule 1/16in Blue/10pk IDEX H&S P-200X	IDEX Health & Science (DE-Erlangen)
Flangeless Nut 1/16in PPS Headless M6 IDEX H&S P-288	IDEX Health & Science (DE-Erlangen)
Neopren, Schlauch als Ring geklebt, 30 Shore, 14,5 · 2,0 mm	Witte Barskamp (DE-Bleckede)
O-Ring EPDM, 70 Shore, 1,42 · 1,52 mm	HUG GmbH (DE-Ergolding)
O-Ring EPDM, 70 Shore, 14,5 · 2,0 mm	COG (D-Pinneberg)
O-Ring EPDM, 70 Shore, 2,0 · 1,5 mm	ERIKS Deutschland (DE-Bielefeld)
O-Ring Silikon, 30 Shore, 14,5 · 2,0 mm	ERIKS Deutschland (DE-Bielefeld)
O-Ring Teflon, 50 Shore, 14,5 · 2,0 mm	August Kuhfuss (DE-Braunschweig)
PTFE-beschichtetes Silizium-Septum	Altmann Analytik (D-München)
Schlauch / Kapillare BOLA S 1810-09, ID: 0,5 bzw. 1,0 mm	Bohlender (DE-Grünsfeld)
Silikonschlauch, peroxidisch vernetzt, ID: 0,76 mm	Cole-Parmer (DE-Wertheim)
Tygon® ST R-3603, ID: 0,76 mm	Cole-Parmer (DE-Wertheim)

3.2 Methoden

3.2.1 Allgemeine Zellkultivierungsmethoden

Alle sterilen Arbeitsschritte der Zellkultivierung erfolgten unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse II. Die hierfür verwendeten Hilfsmittel, Medien, Lösungen, Puffer und sonstigen Substanzen wurden steril bezogen bzw. vor der Verwendung hitzesterilisiert oder sterilfiltriert. Alle Zellarten wurden in Zellkulturinkubatoren in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit einem CO₂-Gehalt von 5 % (V/V) bei 37 °C kultiviert. Die Zellen wurden gemäß den Herstelleranweisungen mit dem *Mycoplasma Test Kit* alle vier Monate auf Mykoplasmen-Kontaminationen untersucht und nötigenfalls mit *Mycoplasma Removal Agent* behandelt. Die weiteren Zellkultivierungsmethoden werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

3.2.1.1 Kultivierung und Subkultivierung

Die Zellkultivierung erfolgte in 25 cm² bzw. 75 cm² Zellkulturflaschen aus Polystyrol. Ein Wechsel des zuvor mittels eines Tischinkubators auf 37°C temperierten Kulturmediums erfolgte alle zwei bis drei Tage. Das Wachstum der Zellen wurde regelmäßig unter dem inversen Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Nach dem Erreichen einer Zellkonfluenz von 80 bis 100 % wurden die Zellen subkultiviert. Hierzu wurden sie zunächst mit PBS gewaschen und gegebenenfalls mit einer EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch die Inkubation mit Trypsin-EDTA-Lösung bei 37 °C von der Kultivierungsoberfläche abgelöst. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt und die Zellen durch zügiges Pipettieren vereinzelt. Die Zellsuspension wurde mittels Coulter-Counter™ Z2 bzw. ViCell™ Counter gezählt und in neue Zellkulturflaschen mit dem jeweiligen Medium überführt. Die genauen Subkultivierungsbedingungen waren abhängig von der jeweilig verwendeten Zelllinie und sind der Tabelle 8 zu entnehmen.

3.2.1.2 Kryokonservierung

Zur Kryokonservierung der Zelllinien wurden die Zellen, wie in 3.2.1.1 beschrieben, abgelöst, vereinzelt und gezählt. Anschließend wurden $1 \cdot 10^6$ bis $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml im Einfriermedium suspendiert und in Einfriergefäße abgefüllt. Das Einfriermedium setzte sich aus fetalem Kälberserum (FKS), dem Kryoprotektivum DMSO und bei einigen Zelllinien zusätzlich aus dem jeweiligen Basalmedium zusammen. Eine Übersicht der Zusammensetzungen der unterschiedlichen Einfriermedien zeigt Tabelle 8. Die Einfriergefäße wurden in einem Gefrierbehälter über Nacht bei -80°C gelagert. Durch diesen mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter wurde eine Einfrier-rate von -1°C pro Minute gewährleistet. Anschließend wurden die Einfriergefäße zur langfristigen Lagerung in die flüssige Stickstoffphase des Stickstofflagertanks (-196°C) überführt.

Zum Auftauen der Zellen wurde das Einfriergefäß zügig im Wasserbad bei 37°C angetaut und anschließend die Zellsuspension im 37°C warmen Zellkulturmedium aufgenommen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 3 min bei 500 g, bevor die Zellen abgesaugt, in neuem Zellkulturmedium suspendiert und in eine neue Zellkulturflasche überführt wurden. Vor der Durchführung eines Versuches wurden die Zellen mindestens einmal subkultiviert.

Tabelle 8: Kultivierungsbedingungen der jeweiligen verwendeten Zelllinie; das Zellkulturmedium Caco-2-MEM bestand aus MEM, 20 % FKS, 1 % Antibiotika/Antimykotika-Lösung, 1 % NEAA und 2 mM L-Glutamin. Die weiteren Zellkulturmedien sind in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

Kultivierungs- bedingungen	hCMEC/D3	cEND	MDCK	SVGmm	Caco-2
Turnus	2x/Woche	1x/Woche	2x/Woche	2x/Woche	1x/Woche
EDTA	-	10 s	15 min	-	2 min
Trypsin-EDTA (0,5 / 0,2 g/l)	3 min	4 min	-	2 min	8 min
Trypsin-EDTA (1,0 / 0,2 g/l)	-	-	20 min	-	-
Einfrier- medium	95 % FKS, 5 % DMSO	90 % cEND- DMEM, 10 % DMSO	75 % MDCK- MEM, 15 % FKS, 10 % DMSO	90 % SVGmm- MEM, 10 % DMSO	75 % Caco-2- MEM, 15 % FKS, 10 % DMSO

3.2.1.3 Immortalisierte humane zerebrale Endothelzelllinie hCMEC/D3

Für die vorliegende Arbeit wurde die humane zerebrale mikrovaskuläre Endothelzelllinie hCMEC/D3 (Abbildung 8) von CELLution Biosystems (C-Burlington) mit einer Passage von 26 bezogen. Die Primärkultur dieser Endothelzellen wurde aus dem Temporallappen einer an Epilepsie erkrankten Spenderin gewonnen. Die Zellen wurden anschließend durch Transduktion mit lentiviralen Vektoren mit Hilfe der humanen Telomerase-Reverse-Transkriptase (hTERT) und des Simian-Virus T-Antigens (SV 40 großes T-Antigen) immortalisiert (Weksler et al. 2005).

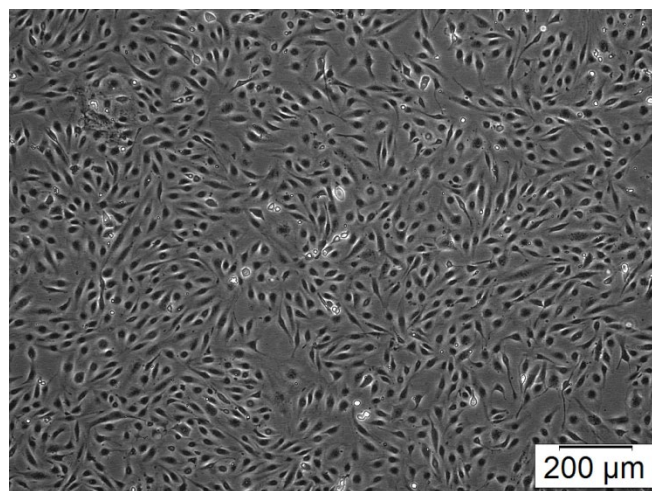


Abbildung 8: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme der humanen zerebralen Endothelzelllinie hCMEC/D3 (Passage 32) am dritten Tag der Kultivierung in EGM-2

Die hCMEC/D3 Zelllinie wurde im Wachstumsmedium EGM-2 bis zu einer Passage von 30 bis 40 kultiviert. EGM-2 wurde nach den Anweisungen des Herstellers aus endothelialelem Basalmedium EBM-2 und *SingleQuots™ Kit* hergestellt. Das Kit bestand aus VEGF, bFGF, einem insulinähnlichen Wachstumsfaktor (*insulin-like growth factor*, IGF-1) und einem epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF) sowie Ascorbinsäure, Gentamicin, Hydrocortison (jeweils ohne spezifizierte Angaben des Herstellers) und 2,4 % (V/V) FKS. Die Wachstumsoberflächen wurden vor der Kultivierung mit Rattenschwanzkollagen beschichtet. Das Kollagen wurde aus Rattenschwanzsehnen sauer extrahiert und bestand überwiegend aus Kollagen Typ I (Stephan Reichl 2003). Vor dem Gebrauch wurde die ethanolische, essigsäure Kollagen I-Stammlösung mit PBS auf 0,15 mg/ml verdünnt. Pro cm² wurden 80 μl der Beschichtungslösung aufgetragen und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss

wurden die Wachstumsoberflächen mit PBS gewaschen und die Zellen nach der Vereinzelung und Zählung, wie in Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben, in einer Zelldichte von $2,5 \cdot 10^4$ Zellen/cm² ausgesät.

3.2.1.3.1 Variationen der Zellkulturmedien

Für die Kultivierung der hCMEC/D3 Zellen in verschiedenen Zellkulturmedien wurden die Zellen schrittweise an das neue Basalmedium adaptiert. Bei jeder Subkultivierung wurde der Anteil des neuen Mediums um 25 % erhöht (van der Valk et al. 2010). Die untersuchten Basalmedien sind in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 9: Variationen der Zellkulturmedien für die Wachstumsversuche mit der hCMEC/D3 Zelllinie; * das PromoCell Kit enthielt EGF (5 ng/ml), bFGF (10 ng/ml), IGF (20 ng/ml), VEGF (0,5 ng/ml), Ascorbinsäure (1 µg/ml) und Hydrocortison (0,2 µg/ml) sowie 2,4 % FKS.

Zellkulturmedium	Supplemente
Mit Serum	
EGM-2 (Standardmedium)	SingleQuots™ Kit
DMEM	SingleQuots™ Kit + 2 mM L-Glutamin
Ham's F-12	SingleQuots™ Kit
DMEM/Ham's F-12 (1:1)	SingleQuots™ Kit
M199	SingleQuots™ Kit + 2 mM L-Glutamin
RPMI 1640	SingleQuots™ Kit + 2 mM L-Glutamin
MCDB 131	SingleQuots™ Kit + 2 mM L-Glutamin
ECGM MV-2	PromoCell Kit* + 1 % Antibiotika/Antimykotika-Lösung
Serumfrei	
hESFM	SingleQuots™ Kit ohne FKS-Zugabe
SF ECM	SingleQuots™ Kit ohne FKS-Zugabe

3.2.1.4 Immortalisierte murine zerebrale Endothelzelllinie cEND

Die murine zerebrale Endothelzelllinie wurde freundlicherweise von Frau Blecharz-Lang von der Charité Berlin zur Verfügung gestellt. Die Primärkultur der cEND Zellen (Abbildung 9) wurde aus den Großhirnrinden von neonatalen Mäusen isoliert. Die Immortalisierung erfolgte durch Transfektion mit dem mittleren T-Onkogen eines murinen Polyomavirus (PymT) (Burek et al. 2012; Förster et al. 2005).

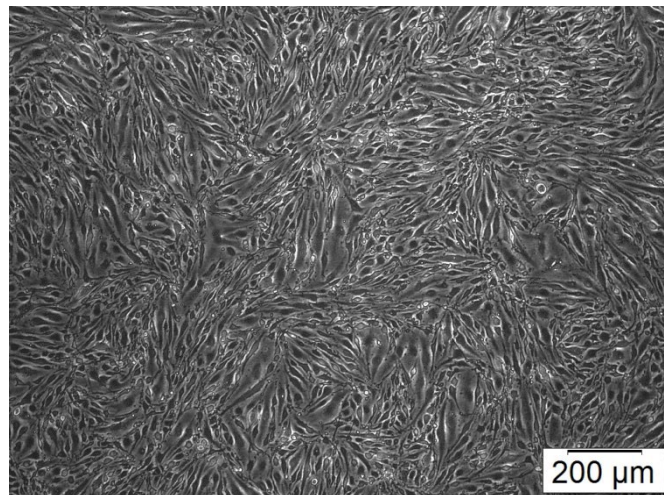


Abbildung 9: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme der murinen zerebralen Endothelzelllinie cEND (Passage 2 ab dem Erhalt der Zelllinie) am zweiten Tag der Kultivierung in cEND-DMEM

Die Zellen wurden in cEND-DMEM, bestehend aus DMEM, 2 % (V/V) MEM-Vitaminen, 2 mM L-Glutamin, 10 % (V/V) FKS und 1 % (V/V) Antibiotika/Antimykotika-Lösung in Zellkulturflaschen kultiviert. Zuvor wurden die Zellkulturflaschen mit 60 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$ einer wässrigen Gelatine-Lösung (5 g/l) für 5 min bei Raumtemperatur beschichtet. Die Zellen wurden, wie in 3.2.1.1 beschrieben, subkultiviert und in einer Verdünnung der Zellsuspension von 1:4 bis 1:6 in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

3.2.1.5 Immortalisierte canine renale Epithelzelllinie MDCK

Die *Madin-Darby canine kidney* (MDCK) Zelllinie (Abbildung 10) wurde aus dem Sammelrohr der Niere eines weiblichen Cocker Spaniels gewonnen. Die Zelllinie lässt sich in die Subtypen I und II einteilen, die beständig unterschiedliche morphologische und funktionelle Eigenschaften zeigen. Die MDCK Zelllinie vom Typ I weist einen 10- bis 100-fach höheren TEER-Wert auf als die MDCK Zelllinie vom Typ II (Sheller et al. 2017; Simonas und Virta 2006). Als Ursache wird eine veränderte TJ-Expression

des Proteins Claudin-2 vermutet (Lipschutz et al. 2005). Die in dieser Arbeit verwendete MDCK Zelllinie vom Typ I, die im Folgenden vereinfacht als MDCK Zelllinie bezeichnet wird, wurde von der Zellbank der *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC) bezogen.

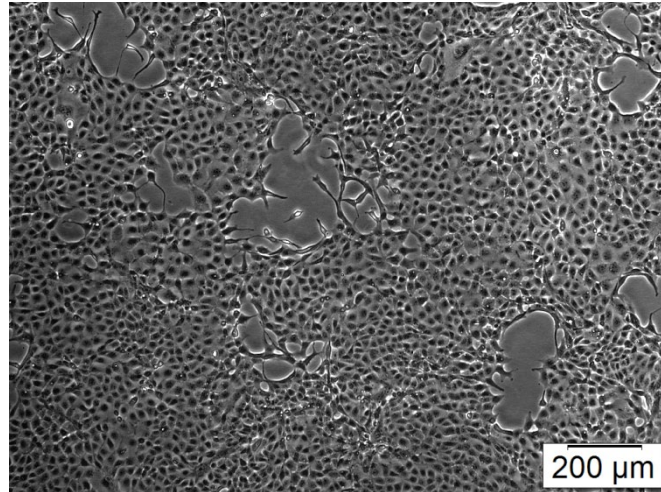


Abbildung 10: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme der caninen Epithelzelllinie MDCK (Passage 34) am dritten Tag der Kultivierung in MDCK-MEM

Bei den Zellen handelt es sich um polarisierte Zellen, die als quaderförmiges, einschichtiges Epithel wachsen. Die Zellen wurden in MDCK-MEM kultiviert, das aus MEM, 10 % (V/V) FKS, 2 mM L-Glutamin und 1 (V/V) % Antibiotika/Antimykotika-Lösung bestand. Waren die Zellen ausreichend konfluent, wurden sie wie im Abschnitt 3.2.1.1 subkultiviert und mit einer Zelldichte von $0,4 \cdot 10^4$ Zellen/cm² ausgesät.

3.2.1.6 Immortalisierte humane Astrozytenzelllinie SVGmm

Die humane Astrozytenzelllinie SVGmm (Abbildung 11) wurde freundlicherweise vom *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NINDS, US-Bethesda) von Prof. Eugene Major in einer Passage von 63 bereitgestellt. Die Zellen wurden zwischen der achten und zwölften Schwangerschaftswoche aus dem primären menschlichen fetalen Gehirn gewonnen und 1985 von E. O. Major et al. durch Transfektion mit dem Adenovirusvektor SV40 immortalisiert (Major et al. 1985).

Zur Kultivierung der Zellen wurde SVGmm-MEM verwendet, das aus MEM, 1 % (V/V) Antibiotika/Antimykotika-Lösung, 10 % (V/V) FKS, 2 mM L-Glutamin und 50 µg/ml Gentamicin bestand. Die Subkultivierung wurde, wie in 3.2.1.1 beschrieben, durchgeführt und Zellverdünnungen von 1:4 bis 1:6 in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

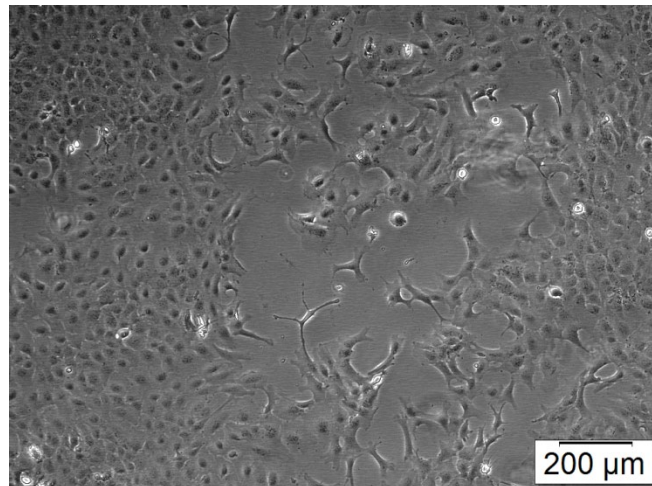


Abbildung 11: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme der humanen zerebralen Astrozytenzelllinie SVGmm (Passage 70) am dritten Tag der Kultivierung in SVGmm-MEM

3.2.2 Proliferationsverhalten von hCMEC/D3

Zur Ermittlung der Proliferationseigenschaften der hCMEC/D3 Zellen in Abhängigkeit ihres Kultivierungsmediums wurden Wachstumskurven über einen Zeitraum von zehn Tagen aufgenommen. Hierfür wurden die Zellen in Kollagen I-beschichteten (0,15 mg/ml) 24-Well-Zellkulturplatten in einer Zelldichte von $2,6 \cdot 10^4$ Zellen/cm² ausgesät und kultiviert (Abschnitt 3.2.1). Zur Bestimmung der Zellzahlen wurden die Zellen zu festgelegten Zeitpunkten, wie unter 3.2.1.1, abgelöst, vereinzelt und gezählt. Die ermittelten Zellzahlen pro ml wurden logarithmisch gegen die Kultivierungszeit aufgetragen und mit der OriginPro Software analysiert. Der sigmoidale Wachstumsverlauf ließ sich in mehrere Phasen unterteilen: die Latenz-Phase (lag-Phase), die exponentielle Wachstumsphase (log-Phase) und die stationäre Phase. Die Populationsverdopplungszeit (PDT) wurde innerhalb der exponentiellen Phase ermittelt.

3.2.3 Untersuchung der Anheftungseffizienz

Zur Untersuchung des Anheftungsvermögens der Endothelzellen an die Wachstumsoberfläche in Abhängigkeit des Zellkulturmediums wurde die Anheftungseffizienz ermittelt. Es wurden $1,3 \cdot 10^4$ Zellen/cm² in Kollagen I-beschichteten (0,15 mg/ml) 24-Well-Zellkulturplatten ausgesät, für 2,5 h kultiviert und, wie in Abschnitt 3.2.1.1 beschrieben, anschließend abgelöst, vereinzelt und gezählt. Die Anheftungseffizienz beschreibt den Quotienten aus der Anzahl adhärenter Zellen und der Gesamtzellzahl im jeweiligen *Well* (Gleichung 3.2).

$$\text{Anheftungseffizienz [\%]} = \frac{\text{Anzahl adhärenter Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \cdot 100 \quad \text{Gleichung 3.2}$$

3.2.4 Untersuchung der Angiogenese

Die angiogenetischen Eigenschaften von hCMEC/D3 Zellen wurde mit Hilfe des *endothelial tube formation assays* untersucht. Dieser beruht auf der Fähigkeit von Endothelzellen, kapillarähnliche Strukturen auf Basalmembranen wie dem Matrigel™ auszubilden. Matrigel™ wird aus dem *Engelbreth-Holm-Swarm* Maussarkom extrahiert und besteht zu ungefähr 60 % aus Laminin, 30 % Kollagen IV und 8 % Entacin sowie aus Heparinsulfatproteoglykanen und diversen Wachstumsfaktoren. Das basalmembranähnliche Substrat wird in vielen Modellen angewendet, auch wenn es sich von der physiologischen Membran unterscheidet und die genaue Zusammensetzung variieren kann (LeBleu et al. 2007).

Da Matrigel™ bei Temperaturen über 10 °C geliert, wurden vor der Verwendung die Hilfsmittel gekühlt und anschließend alle Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt. Pro cm² Wachstumsfläche einer 24-Well-Zellkulturplatte wurden 132 µl einer 9,1 mg/ml Matrigel™-Lösung aufgetragen und 1 h bei 37 °C inkubiert. Die hCMEC/D3 Zellen wurden subkultiviert (Abschnitt 3.2.1.1), $5,3 \cdot 10^4$ Zellen/cm² ausgesät und für 48 h kultiviert. Das Zellverhalten wurde in festgelegten Zeitabständen mikroskopiert und fotografiert.

3.2.5 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Lokalisierung des Endothelmarkers vWF und der TJ-Proteine Claudin-5, ZO-1 und Occludin sowie des AJ-Proteins VE-Cadherin wurden immunzytochemische Färbungen durchgeführt (Abbildung 12).

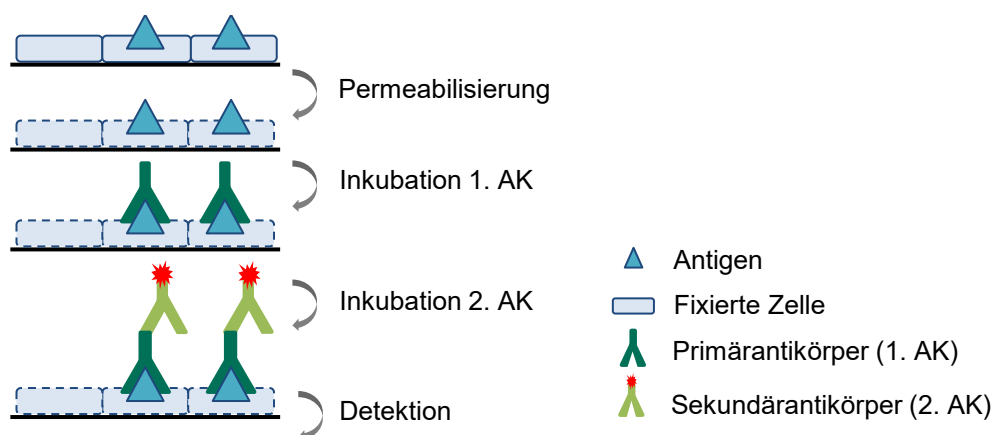


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte bei Immunfluoreszenzfärbungen

Zunächst wurden $2,5 \cdot 10^4$ Zellen/cm² in Kollagen I-beschichteten (0,15 mg/ml) 8-Well-Kammerobjektträgern ausgesät und bis zur Konfluenz von 80 % kultiviert. Dann wurden die Zellen für 10 min mit einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und mit 0,1 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen folgte eine Inkubation mit 10 % (V/V) Ziegsenserum in PBS-T für 30 bis 45 min bei Raumtemperatur. Der spezifische polyklonale Primärantikörper wurde mit 0,1 % BSA in TBS-T auf die gewünschte Verdünnung (Abschnitt 3.1.1, Tabelle 1) gebracht. Die Inkubation des Primärantikörpers erfolgte im Anschluss bei 4 °C über Nacht. Parallel dazu wurden die Negativkontrollen ohne den Primärantikörper durchgeführt. Die Zusammensetzungen der verwendeten Puffer und Lösungen stehen in Tabelle 10.

Tabelle 10: Zusammensetzung der verwendeten (Puffer-)Lösungen

(Puffer-) Lösung	Komponenten
4%ige Paraformaldehyd-Lösung	4 % PFA und 10 % Saccharose in PBS
PBS mit Tween 20 (PBS-T)	0,1 % Tween 20 in PBS
Tris-buffered saline mit Triton X-100 (TBS-T), pH 8,0	150 mM Natriumchlorid, 10 mM Tris-HCl und 0,05 % Triton X-100 in 1 l bidestilliertem Wasser

Im folgenden Schritt wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper, der mit PBS 1:200 verdünnt wurde, bei Raumtemperatur lichtgeschützt für 1 h inkubiert. Um die Zellkerne sichtbar zu machen, wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit Hoechst 33342 (20 µg/ml) in PBS für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der ungebundene Farbstoff wurde durch einen zweimaligen Waschschrift mit PBS entfernt. Während der einzelnen Arbeitsschritte wurde darauf geachtet, dass die Zellen vollständig mit Flüssigkeit benetzt blieben, um ein Austrocknen zu vermeiden. Die fixierten und gefärbten Zellen wurden im Anschluss mit *FluorSave*[™] Reagenz luftblasenfrei eingedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht. Als positive Referenzen wurden für Claudin-5 primäre porcine Gehirndothelzellen (PBEC), für ZO-1 die Zelllinie Caco-2 und für Occludin und VE-Cadherin die Zelllinie HCE-T verwendet.

3.2.6 Genexpressionsanalyse

Zur Untersuchung des Genexpressionsstatus der hCMEC/D3 Zellen, wurde zunächst die *messenger ribonucleic acid* (mRNA) aus den Zellen isoliert und mittels Reverser Transkriptase-Reaktion (RT-Reaktion) in *complementary deoxyribonucleic acid* (cDNA) umgeschrieben. Anschließend wurden die spezifischen Nukleinsäuresequenzen mit Hilfe der quantitativen *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) amplifiziert und quantifiziert. Um eine Kontamination mit fremder RNA zu vermeiden, wurde der Arbeitsbereich vor der Durchführung des Versuches mit der Dekontaminationslösung RNaseAway[™] gereinigt. Außerdem wurden alle Arbeitsschritte mit DNA-, DNase- sowie RNase-freien Reagenzien und Materialien durchgeführt und Nitrilhandschuhe verwendet.

3.2.6.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte aus $5 \cdot 10^6$ bis $10 \cdot 10^6$ Zellen mit Hilfe des Reagenzes TRIzol[™], das zur Zelllyse Guanidiniumthiocyanat und zur Lösung der RNA Phenol enthält. Erst wurden die Zellen kräftig im TRIzol[™]-Reagenz resuspendiert und 5 min lang inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte durch eine 2-minütige Inkubation mit Chloroform und einer anschließenden Zentrifugation mit $1,2 \cdot 10^4$ g bei 2 – 8 °C

für 15 min. Es bildete sich eine obere, hydrophile Phase mit RNA, eine Interphase mit DNA und eine untere, organische Phase mit Proteinen. Die RNA-haltige, hydrophile Phase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 10 min mit Isopropanol inkubiert, wodurch die RNA präzipitierte. Die Probe wurde noch einmal mit $1,2 \cdot 10^4$ g bei $2 - 8^\circ\text{C}$ für 10 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig entfernt. Der Rückstand wurde mit 75 % (V/V) Ethanol versetzt und erneut mit $7,5 \cdot 10^3$ g bei $2 - 8^\circ\text{C}$ für 5 min zentrifugiert. Der RNA-Rückstand wurde in RNase-freiem Wasser bei $55 - 60^\circ\text{C}$ für 10 min gelöst.

Im Anschluss wurde der RNA-Gehalt durch Absorptionsmessungen mit dem NanoDrop-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm ermittelt. Das Absorptionsverhältnis bei 260 und 280 nm (A_{260}/A_{280}) wurde zur Bestimmung der Reinheit verwendet. Ein Verhältnis von 1,8 wurde als reine DNA verstanden, während 2,0 als reine RNA angesehen wurde. Ein Verhältnis unter 1,8 war ein Hinweis auf eine Verunreinigung mit Phenol oder Proteinen (Müller 2016). Bis zur Durchführung der cDNA-Synthese wurde die RNA bei -80°C gelagert.

3.2.6.2 cDNA-Synthese

Zum Entfernen von Verunreinigungen mit genomischer DNA wurde vor der cDNA-Synthese die DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen (*iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis Kit*) geschnitten. Für die Reaktion wurde 1 µg RNA in einem Volumen von 14 µl RNase-freiem Wasser verwendet. Zu jeder Probe wurden *iScript™ DNase* und *iScript™ DNase Buffer* hinzugegeben und der Ansatz gut gemischt. Die Reaktion erfolgte dann im *Thermocycler* bei vorgegebenem Temperaturprotokoll. Eine Übersicht über die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes sowie das Temperaturprofil sind in Tabelle 11 bzw. in Tabelle 12 dargestellt. Um RNA-Veränderungen zu vermeiden, wurde direkt im Anschluss die cDNA-Synthese durchgeführt. Hierzu wurde zu jedem Reaktionsansatz *iScript™ Reverse Transcription Supermix* hinzugegeben. Dieser wurde bei den Kontrollproben durch den *iScript™ no-Reverse Transcription Control Supermix* ersetzt. Nach der Behandlung im *Thermocycler* wurden die Proben 1:4 bzw. 1:5 mit RNase-freiem Wasser verdünnt und bis zur Durchführung der qRT-PCR bei -20°C gelagert.

Tabelle 11: Übersicht der Reaktionsansätze für die DNA-Restriktion und die cDNA-Synthese

Komponente	Volumen pro Reaktion [μ l]
DNA-Restriktion	
iScript™ DNase	0,5
iScript™ DNase Buffer	1,5
<i>Endvolumen</i>	<i>2,0</i>
cDNA-Synthese	
iScript™ Reverse Transcription Supermix	4,0
DNase behandeltes RNA-Template	16,0
<i>Endvolumen</i>	<i>20,0</i>

Tabelle 12: Temperaturprofil der DNA-Restriktion und der cDNA-Synthese im *Thermocycler*

Prozess	Temperatur [°C]	Zeit [min:s]	Anzahl der Zyklen
DNA-Restriktion			
DNA-Hydrolyse	25	5:00	1
DNase-Inaktivierung	75	5:00	1
Lagerung (optional)	4	bis zur cDNA-Synthese	1
cDNA-Synthese			
Primeranlagerung	25	5:00	1
Reverse Transkription	46	20:00	1
Inaktivierung der RT	95	1:00	1
Lagerung (optional)	-20	∞	1

3.2.6.3 Quantitative *Real-Time* Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der quantitativen *Real-Time* Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) wurden spezifische Gensequenzen auf der cDNA vervielfältigt und durch Fluoreszenzmessungen quantifiziert. Nach einer thermischen Auftrennung des DNA-Doppelstrangs lagerten sich die Primer spezifisch an die jeweiligen Sequenzen an. Von diesen ausgehend amplifizierte das Enzym DNA-Polymerase mit Hilfe von korrespondierenden Nukleotidsequenzen den cDNA-Einzelstrangabschnitt. Durch die Einlagerung des Fluoreszenzfarbstoffes *SYBR Green* in die DNA konnte die

Quantifizierung während des Zyklus in Echtzeit verfolgt werden. Der PCR-Zyklus wurde 40-mal wiederholt, um eine exponentielle Vervielfältigung des Genabschnittes zu erreichen. Für die Durchführung wurde das *SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix-Kit* mit dem Temperaturprofil aus Tabelle 14 verwendet. Während der Versuchsvorbereitungen wurden die Reagenzien auf Eis gelagert. Der *SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix*, der Forward- und Reverseprimer und das RNase-freie Wasser wurden zusammen pipettiert und gründlich gemischt (Tabelle 13). Die cDNA wurde, abhängig von dem Zielgen, mit einem Gehalt von 25 bzw. 50 ng pro *Well* eingesetzt. Bei der Negativkontrolle wurde die cDNA durch ein äquivalentes Volumen an RNase-freiem Wasser ersetzt. Zuletzt wurde die 96-*Well*-Platte mit einer PCR-Verschlussfolie verschlossen und im *Thermocycler* der Firma Bio-Rad mit dem Temperaturprofil aus Tabelle 14 analysiert. Die Schmelzkurvenanalyse diente zur Identifikation von unspezifischen Amplifikationsprodukten und Primerdimeren. Alle Proben wurden als Triplikate vermessen.

Tabelle 13: Übersicht des Reaktionsansatzes für die qRT-PCR pro *Well* einer 96-*Well*-Platte; ACTB und GAPDH wurden als Referenzgene analog zu dem jeweiligen Zielgen eingesetzt.

Komponente	Volumen pro Reaktion [µl]	
	CDH5, OCLN, TJP1	CLDN5
SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix	10,0	10,0
Forward-/Reverseprimer	1,0	1,5
RNase-freies Wasser	7,0	4,5
cDNA bzw. Template (zum Schluss)	2,0	4,0
<i>Endvolumen</i>	<i>20,0</i>	<i>20,0</i>

Tabelle 14: Temperaturprofil für die qRT-PCR

Prozess	Temperatur [°C]	Zeit [min:s]	Anzahl der Zyklen
Aktivierung	95	1:00	1
Denaturierung	95	0:05	40
Primeranlagerung	60	0:30	40
Aufschmelzen	95	0:10	1
Schmelzkurve	65 – 95 (0,5 °C Schritte)	0:05/Schritt	1

Die Auswertung erfolgte nach der von Hellemans et al. weiterentwickelten Pfaffl-Methode (Hellemans et al. 2007). Bei dieser effizienzkorrigierten relativen Quantifizierungsmethode wird die Expression des Zielgens mittels der Expression mehrerer Referenzgene normalisiert und die Effizienz eines jeden Gens berücksichtigt (Gleichung 3.3). Die Effizienzen der eingesetzten Primer sind in Abschnitt 3.1.2 in Tabelle 2 dargestellt. Die Pfaffl-Effizienz entspricht der Primer-effizienz zuzüglich 1,0. Als Referenzgene wurden ACTB und GAPDH verwendet.

$$\text{NRQ} = \frac{E_{\text{Zielgen}}^{\Delta \text{Ct}_{\text{Zielgen}} (\text{Kontrolle} - \text{Test})}}{\sqrt[n]{\prod_{i=1}^n E_{\text{Referenzgen},i}^{\Delta \text{Ct}_{\text{Referenzgen},i} (\text{Kontrolle} - \text{Test})}}} \quad \text{Gleichung 3.3}$$

NRQ = normalisierte relative Genexpression (*normalized relative quantity*)

Ct = Schwellenwertzyklus (*cycle threshold*)

E = Pfaffl-Effizienz

3.2.7 Zellkultivierung im Transwell™- bzw. ThinCert™-Modell

Das statische Blut-Hirn-Schranke-Modell fand als Mono- sowie als Ko-Kulturmodell Anwendung. Die Kultivierung und die jeweiligen Untersuchungsmethoden werden in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

3.2.7.1 Aufbau einer Mono-und Ko-Kultur mit hCMEC/D3

Zur Charakterisierung der Barriereigenschaften von hCMEC/D3 Zellen wurden die Zellen in 12-Well-Zellkultureinsätzen kultiviert. Hierbei fanden entweder Transwell™- oder ThinCert™-Einsätze mit einer Membran aus PET und einer Porengröße von 0,4 µm Verwendung, die zuvor mit 0,15 mg/ml Kollagen I beschichtet wurden. Im Anschluss erfolgte die Zelleinsaat mit einer Zelldichte von $4,4 \cdot 10^4$ Zellen/cm² bis $1,8 \cdot 10^5$ Zellen/cm². Das luminale Kompartiment wurde mit 0,5 ml und das basolaterale Kompartiment mit 1,5 ml EGM-2 gefüllt. Zwei Tage nach der Aussaat wurde das Kultivierungsmedium EGM-2 durch das Assaymedium (AM) ersetzt, das aus EBM-2, 1 ng/ml bFGF, 2,5 % (V/V) FKS, 0,55 µM Hydrocortison, 10 mM HEPES und 1 % (V/V) Antibiotika/Antimykotika-Lösung bestand. Das Wachstum sowie die

Morphologie der Zellen wurden regelmäßig unter dem inversen Phasenkontrastmikroskop kontrolliert und das Medium alle zwei bis drei Tage gewechselt. Die Kultivierung als Mono-Zellkulturmodell erstreckte sich über einen Zeitraum von sieben bis zehn Tagen und wurde nur für den Langzeitversuch auf 27 Tage erweitert. In regelmäßigen Zeitabständen wurde der TEER-Wert ermittelt (Abschnitt 3.2.7.4).

Zur Untersuchung des Einflusses von Astrozyten auf die endotheliale Barriereintegrität wurde eine Ko-Kultur aus hCMEC/D3 und SVGmm Zellen in Kollagen I-beschichteten (0,15 mg/ml) 12-Well-Zellkultureinsätzen (PET, 0,4 µm) aufgebaut. Zum Aufbau einer direkten Ko-Kultur wurden die SVGmm Zellen in einer Zelldichte von $2,6 \cdot 10^4$ Zellen/cm² auf die basolaterale Seite der Membran ausgesät. Hierfür wurden die Zellkultureinsätze umgedreht in eine 6-Well-Zellkulturplatte eingebracht und die Zellen in 200 µl SVGmm-Medium über Nacht inkubiert. Ein 6-Well-Metallabstandshalter sorgte für einen ausreichenden Abstand zwischen der Zellsuspension und dem Deckel. Für den Aufbau der indirekten Ko-Kultur wurden die SVGmm Zellen in einer Zelldichte von $2,6 \cdot 10^4$ Zellen/cm² auf den Well-Boden der Zellkulturplatte eingesät. Am nächsten Tag wurde das SVGmm-Medium entfernt und die hCMEC/D3 Zellen, wie zuvor beschrieben, ausgesät und kultiviert.

3.2.7.2 Variationen von Kultivierungsbedingungen

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Kultivierungsbedingungen auf die Barriereintegrität von hCMEC/D3 Zellen wurden neben den Zellkulturmedien (Abschnitt 3.2.1.3.1) auch die Membranporengröße, das Beschichtungsmaterial, die Medienzusätze und das Zellarrangement variiert. Eine detaillierte Übersicht liefert Tabelle 15. Abgesehen von den jeweilig variierten Faktoren, wurden die Standardbedingungen, wie in Abschnitt 3.2.7.1 erläutert, beibehalten.

Tabelle 15: Kultivierungsvariationen der hCMEC/D3 Zelllinie; RT = Raumtemperatur

Kultivierungsbedingungen	Bemerkung
Porengröße	
0,4, 1,0 und 3,0 µm	Verwendung von Kollagen I-beschichteten (0,15 mg/ml) ThinCert™-Zellkultureinsätzen

Tabelle 15: Kultivierungsvariationen der hCMEC/D3 Zelllinie; RT = Raumtemperatur

Kultivierungsbedingungen	Bemerkung
Beschichtungsmaterial	
Ohne Beschichtung	Mit PBS angefeuchtet
Kollagen I	150 µg/ml, 1 h bei 37 °C
Kollagen G	133 µg/ml, 12 h bei RT
Kollagen IV	50 µg/ml, 3 h bei RT
Fibronektin	50 µg/ml, 3 h bei RT
Kollagen IV + Fibronektin	300 µg/ml + 7,5 µg/ml, jeweils 2 h bei RT
Kollagen IV + Fibronektin + Laminin (5:2:3)	Jeweils 50 µg/ml, 3 h bei RT
Kollagen IV + Fibronektin + Laminin (1:1:1)	Jeweils 50 µg/ml, 3 h bei RT
Medien- und Medienzusätze	
EGM-2	Ab Tag 0, ohne Wechsel zu AM
AM	Ab Tag 0
AM ohne Serum	Ab Tag 1 bzw. ab Tag 3
AM mit 0,25 %, 0,5 % bzw. 10,0 % Serum	Ab Tag 0
AM ohne HC	Ab Tag 0
AM mit 550 bzw. 1000 nM HC	Ab Tag 1 und 3
AM mit 250 µM pCPT-cAMP und 17,5 µM Ro-20-1724	Ab Tag 0
AM mit zusätzlichem 2 mM Calcium	Ab Tag 0
Zellarrangement	
Mono-Kultur mit hCMEC/D3	Normale Zellorientierung
Mono-Kultur mit SVGmm	Inverse Zellorientierung
Ko-Kultur mit hCMEC/D3 und SVGmm	Direkte und indirekte Ko-Kultur

3.2.7.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Für die morphologische Untersuchung eines endothelialen Monolayers im Querschnitt wurden die hCMEC/D3 Mono-Kulturen für sieben Tage in 12-Well-Zellkultureinsätzen kultiviert (Abschnitt 3.2.7.1) und anschließend für 24 h mit 4%iger Formaldehydlösung fixiert. Zur Dehydrierung der Zellen wurden die Zellkultureinsätze nacheinander je einmal mit 30, 50, 70 und 90%igem (V/V) Ethanol und dreimal mit absolutem Ethanol für jeweils 30 min inkubiert. Danach wurden die

Einsätze mit einer 1:1-Mischung aus Basisflüssigkeit Technovit 7100 und absolutem Ethanol für 2 h und in reiner Basisflüssigkeit Technovit 7100 für 1 h vorinfiltriert. Für den eigentlichen Infiltrationsschritt wurden die Zellkultureinsätze mit einem Gemisch aus Basisflüssigkeit Technovit 7100 und 1 % Härter über Nacht bei 4 °C versetzt. Technovit 7100 besteht aus Hydroxyethylmethacrylat (HEMA), das bei niedrigen Temperaturen polymerisiert und zur Herstellung von dünnen Probequerschnitten geeignet ist.

Für die Polymerisationsreaktion wurden die Membranen mit den Zellen vorsichtig von den Zellkultureinsätzen gelöst und mit einem Skalpell halbiert. Die halbierten Membranen wurden in die Histoform S platziert und 1 ml Polymerisationslösung, die aus der Infiltrationslösung und 6,67 % Härter II bestand, wurde hinzugegeben. Nachdem die Proben innerhalb von 2 h bei Raumtemperatur ausgehärtet waren, wurden sie mit dem schnell härtenden Harz Technovit 3040 überzogen und nach weiteren 10 min mittels einer auf den Proben platzierten Halterung aus ihrer Einbettform gelöst. Im Anschluss konnten die Proben mit einem Mikrotom dünn geschnitten und auf Glasträger aufgebracht werden.

Zur Visualisierung der biologischen Strukturen wurden die Probenschnitte mit den Farblösungen Hämatoxylin und Eosin gefärbt und mikroskopisch untersucht. Hämatoxylin färbt basophile Zellstrukturen, wie z. B. Zellkerne, blau und Eosin acidophile Zellstrukturen, wie z. B. Proteine im Zytoplasma und Mitochondrien, rosa. Die Probenschnitte wurden für 40 min mit Hämatoxylin-Lösung inkubiert und danach einige Minuten mit Leitungswasser gewaschen. Anschließend wurden sie 45 min lang mit 0,5 % Eosin-G-Lösung gefärbt und erneut mit Leitungswasser gewaschen. Zur Entfärbung von unspezifischen Strukturen wurden die Probenschnitte kurzzeitig in einem Behälter mit je 70, 90 und 100%igem (V/V) Ethanol gehalten. Nach einer kurzen Trocknungszeit wurden die Objektträger mit Eukitt® eingedeckt und unter dem Mikroskop begutachtet.

3.2.7.4 Transendothelialer elektrischer Widerstand

Die TEER-Messung stellt eine nicht-invasive Methode zur Bestimmung der Barriereintegrität von Zellmonolayern dar. Sie erfolgte mit Hilfe des Messgerätes EVOM²® bei einer Frequenz von 12,5 Hz. Das Messgerät war hierbei, abhängig von dem Zellkulturmodell, entweder mit der Endohm®-Kammer oder den STX2®-Elektroden verbunden. Der gemessene TEER-Wert kann mit dem parazellulären Widerstand gleichgesetzt werden, da dieser wesentlich geringer ist als der transzelluläre Widerstand.

Vor der Versuchsdurchführung wurden die Elektroden mit 70%igem (V/V) Ethanol gereinigt, mit dem jeweiligen Zellkulturmedium bei Raumtemperatur äquilibriert und der Widerstand des Zellkulturmediums gemessen (Blankwert). Der TEER-Wert wurde während der Zellkultivierung auf Zellkultureinsätzen mindestens alle drei Tage sowie vor und nach der Durchführung von Permeationsuntersuchungen erfasst. Für jedes Experiment wurde von dem gemessenen Widerstand der Widerstand eines unbesiedelten und gegebenenfalls beschichteten Zellkultureinsatzes (Leerwert) subtrahiert. Anschließend wurde zur Bestimmung des TEER-Wertes in $\Omega \cdot \text{cm}^2$ der resultierende Wert mit der Wachstumsfläche der Membran multipliziert.

3.2.7.5 Statische Permeationsuntersuchungen

Ein gebräuchlicher Parameter zur Bestimmung der Permeabilität von Blut-Hirn-Schranke-Modellen ist der scheinbare (apparente) Permeationskoeffizient. Die Permeationsuntersuchungen wurden in 12-Well-Zellkultureinsätzen durchgeführt. Vor und nach jedem Versuch wurde der TEER-Wert, wie in Abschnitt 3.2.7.4 beschrieben, gemessen. Vor den Permeationsuntersuchungen wurden die Zellen eine halbe Stunde in KRB (Tabelle 16) bei 37 °C äquilibriert.

Tabelle 16: Zusammensetzung des Puffers KRB

Pufferlösung	Komponenten
<i>Krebs-Ringer buffer</i> (KRB), pH 7,4	6,8 g NaCl, 0,14 g NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O, 2,1 g NaHCO ₃ , 1,1 g D-Glucosemonohydrat, 0,26 g CaCl ₂ · 6 H ₂ O, 3,575 g HEPES, 0,4 g KCl und 0,2 g MgSO ₄ · 7 H ₂ O in 1 l bidestilliertem Wasser

Für die Permeation wurde das Akzeptor-Kompartiment des Zellkulturmodells mit 1,5 ml KRB und das Donor-Kompartiment mit 0,5 ml Markersubstanz-Lösung gefüllt. Als hydrophile und den parazellulären Transport anzeigende Markersubstanz wurde Natriumfluoreszein (NaF) in einer Konzentration von 25 bzw. 250 µg/ml oder Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)-Dextran 4 kDa (FD4) in einer Konzentration von 250 µg/ml eingesetzt. Vor der Verwendung wurden das Akzeptor- und Donor-Medium auf 37 °C temperiert. Die Permeation wurde in einem Tischinkubator bei 37 °C auf einem Basisplattenschüttler bei 200 U/min durchgeführt. Über einen Zeitraum von 150 min wurde in regelmäßigen Zeitabständen 100 µl Proben aus dem Akzeptor-Medium entnommen und durch die äquivalente Menge an KRB ersetzt. Handelte es sich um ein inverses Zellkulturmodell wurden 1,0 ml Donor-Lösung und 0,5 ml Akzeptor-Lösung verwendet und jeweils 50 µl Proben gezogen und durch KRB ersetzt.

Die Proben wurden direkt in eine schwarze 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und mit einem Fluoreszenzmikroplattenleser bei einer Anregungswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 535 nm vermessen. Anhand der Probenkonzentrationen wurde die Menge an permeierter Donor-Lösung berechnet und über die Zeit aufgetragen. Der Flux der Markermoleküle und der scheinbare Permeationskoeffizient (P_{app}) wurde aus dem linearen Anstieg der Permeationskurve berechnet (Gleichung 3.4 und Gleichung 3.5).

$$J \text{ [} (\mu\text{g}/\text{cm}^2) \cdot \text{s} \text{]} = \frac{\Delta Q}{\Delta t \cdot A} \quad \text{Gleichung 3.4}$$

J = Flux

Q = Substanzmenge

A = exponierte Fläche

$$P_{app} \text{ [cm/s]} = \frac{J}{C_0} \quad \text{Gleichung 3.5}$$

C_0 = Ausgangskonzentration

P_{app} = scheinbarer Permeationskoeffizient

t = Zeit

Die Permeation der Markermoleküle erfolgte durch einen Zellmonolayer, der auf einer Membran mit 0,4 µm Poren kultiviert wurde. Die Membran selbst stellt auch eine Permeationsbarriere dar. Die Berechnung des endothelialen Permeabilitätskoeffizienten (Gleichung 3.6) wurde unter Einbezug der Ergebnisse eines unbesiedelten Zellkultureinsatzes durchgeführt (Strazza et al. 2016; van der Helm et al. 2016a).

$$\frac{1}{P_e} = \frac{1}{P_{app}} - \frac{1}{P_m} \quad \text{Gleichung 3.6}$$

P_{app} = Permeationskoeffizient gesamt (scheinbarer)

P_e = Permeationskoeffizient der Endothelzellen

P_m = Permeationskoeffizient der unbesiedelten Membran

3.2.7.6 Materialtestung

Vor den eigentlichen Kultivierungsversuchen im DynaMiTES wurden die verschiedenen DynaMiTES-Materialien auf ihre Zellverträglichkeit untersucht und nötigenfalls durch ein zellverträgliches Material ersetzt. Für die Materialtests wurden die hCMEC/D3 Zellen mit einer Zelldichte von $4,4 \cdot 10^4$ Zellen/cm² auf beschichteten ThinCert™-Membranen ausgesät. Die Probenstücke wurden auf den unteren *Well*-Boden ohne direkten Kontakt zu den Zellen platziert. Bei der Materialtestung der Schläuche wurde das Medium zunächst für 24 h in den Schläuchen inkubiert, bevor es anschließend auf die Zellen übertragen wurde. Diese indirekte Inkubation der Materialien wurde unmittelbar nach der Aussaat oder nach dem Erreichen der Konfluenz für drei Tage durchgeführt.

Nach der Inkubation wurden die Zellen auf ihre mitochondriale Aktivität mit Hilfe eines kolorimetrischen Farbstofftests untersucht. Der Tetrazoliumfarbstoff Methylthiazolyldiphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird durch NAD(P)H-abhängige zelluläre Oxidoreduktase-Enzyme in den Zellen zu einem unlöslichen Produkt namens Formazan reduziert. Formazan ist blau gefärbt und wird über die Zellyse freigesetzt, bevor es durch UV-Absorption bestimmt werden kann.

Das MTT-Reagenz ist lichtempfindlich und daher wurden alle Schritte lichtgeschützt durchgeführt. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit 0,5 ml 0,05 % (m/V) MTT-Lösung für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 300 µl DMSO zur Zelllyse auf einem Basisplattenschüttler bei 200 U/min für 10 min inkubiert. Die Farbstofflösung wurde dreimal auf und ab pipettiert und entweder direkt vermessen oder in schwarzen Reaktionsgefäßen bei -20 °C gelagert. Die UV-Absorptionsmessung wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm nach einer Schüttelzeit von 10 Sekunden mit dem PowerWave XS Mikroplattenleser unter Verwendung des Softwareprogramms Gen5 durchgeführt. Die unbehandelte und unveränderte Referenz wurde auf 100 % Zellebensfähigkeit gesetzt (Positivkontrolle). Als Negativkontrolle dienten Zellen, die zuvor mindestens 10 min mit 0,05 % (m/V) Triton X-100 behandelt wurden.

3.2.8 Zellkultivierung im *Cerebral DynaMiTES*

Neben der statischen Kultivierung in konventionellen 12-Well-Zellkultureinsätzen wurden die hCMEC/D3 Zellen auch im dynamischen Zellkulturmodell DynaMiTES kultiviert. Informationen zum Modellaufbau und den verwendeten Materialien sind in Abschnitt 3.1.7 erläutert. Der Versuchsaufbau und die Durchführung der dynamischen Kultivierung werden in den folgenden Abschnitten beschrieben.

3.2.8.1 Vorkultivierung einer Mono- und Ko-Kultur mit hCMEC/D3

Für eine Kultivierung im DynaMiTES musste die herkömmliche Kultivierung modifiziert werden. Hierbei wurde die Zellausrichtung von der Oberseite (normal) auf die Unterseite (invers) der Transwell™-Membranen abgeändert. Diese Modifikation war wichtig, damit der Flüssigkeitsstrom im DynaMiTES am Zellmonolayer entlangströmen konnte. Für die inverse Kultivierung wurde zunächst die Unterseite der Membran mit Kollagen I (0,15 mg/ml) beschichtet und je nach Experiment wurden die hCMEC/D3 Zellen in einer Zelldichte von $4,5 \cdot 10^4$ bis $1,3 \cdot 10^5$ Zellen/cm² in 200 µl Medium auf die Kollagenschicht ausgesät und für 6 h invers inkubiert. Eine Ausnahme mit einer Inkubationszeit von 3 h stellte der Versuch dar, bei dem die normale und inverse Kultivierung miteinander verglichen wurden.

Bei der inversen Aussaat wurde eine 6-Well-Zellkulturplatte und ein passender Metallabstandshalter zu Hilfe genommen (Abschnitt 3.2.1.6). Um ein Austrocknen des Zellsuspensionstropfens auf der Membran zu verhindern, wurde die 6-Well-Zellkulturplatte mit PBS gefüllt. Nach der Inkubationszeit wurde das restliche Medium vorsichtig entfernt und die Zellkultureinsätze wurden in ihrer vorgesehenen Ausrichtung in einer 12-Well-Zellkulturplatte für ein bis vier Tage kultiviert (Abschnitt 3.2.7.1).

Im Unterschied zum Mono-Kulturmodell wurden bei der Ko-Kultivierung zunächst die SVGmm Zellen mit einer Zelldichte von $5,4 \cdot 10^4$ Zellen/cm² auf die obere Seite der Membran ausgesät und für 24 h im SVGmm Medium kultiviert. Zur inversen Aussaat der hCMEC/D3 Zellen wurde das SVGmm Medium entfernt und die Zellkultureinsätze vorsichtig umgekehrt in 6-Well-Zellkulturplatten überführt. Jedes Well war beim Überführen mit EGM-2 gefüllt, damit die SVGmm Zellen weiterhin mit Medium versorgt werden konnten. Es wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen unter dem Zellkultureinsatz bildeten. Die hCMEC/D3 Zellen wurden daraufhin mit einer Zelldichte von $1,3 \cdot 10^5$ Zellen/cm² auf die untere Seite der Membran ausgesät und für 6 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellenkultureinsätze in ihrer vorgesehenen Ausrichtung in die 12-Well-Zellkulturplatte überführt und mit 1,5 ml EGM-2 im Akzeptor-Kompartiment und mit 0,5 ml EGM-2 im Donor-Kompartiment für drei Tage weiter kultiviert.

3.2.8.2 Statische und dynamische Kultivierung im DynaMiTES

Vor der Verwendung wurde das auseinandergebaute DynaMiTES flächendeckend mit 70%igem (V/V) Ethanol besprüht und unter der Sicherheitswerkbank der Sicherheitsklasse II abgedampft. Die Schläuche, Hülsen, Schrauben und die mittlere Ebene wurden autoklaviert. Anschließend wurde das System zusammengebaut und dreimal mit sterilem PBS gespült. Die vorkultivierten Zellen wurden in das DynaMiTES eingesetzt und entweder dynamisch oder statisch weiter kultiviert (Abbildung 13). Während des Einsetzprozesses wurde zur Minimierung des Gegendruckes einer der seitlichen Schläuche entfernt. Anschließend wurde das System bei der Befüllung des Mediums leicht schräg nach oben gehalten, um Luftblasen leichter aus dem Donor-Kompartiment zu entfernen.

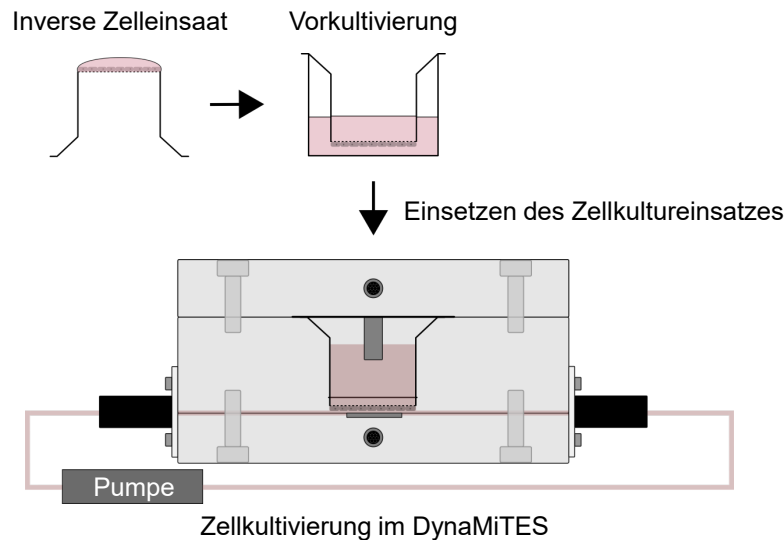


Abbildung 13: Kultivierungsschemata des DynaMiTES; die Zellen wurden invers eingesät, für ein bis vier Tage vorkultiviert und anschließend ins DynaMiTES eingesetzt.

Das DynaMiTES wurde an den seitlichen Hülen über flexible Schläuche mit der Peristaltik- bzw. Spritzenpumpe verbunden. Um auftretende Undichtigkeiten zu minimieren, wurden für die Langzeituntersuchungen (≥ 24 h) Spritzenpumpen im Infusions- und Rückzugsmodus eingesetzt. Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass es zwischen der Verwendung von Schlauch- und Spritzenpumpe keinen Unterschied hinsichtlich der endothelialen Zellviabilität gibt. Je nach Versuchsaufbau variierten die Flussraten von 0,03 bis 3,3 ml/min und die Kultivierungszeiträume von 3 bis 72 h. Die Versuche wurden in CO_2 -unabhängigem Medium (CO_2 -IDM) im Tischinkubator durchgeführt. Vergleichbar mit dem Assaymedium wurde dem CO_2 -ID Medium 0,55 μM Hydrocortison, 1 % (V/V) Antibiotika/Antimykotika-Lösung, 1 ng/ml bFGF, 2,5 % (V/V) FKS und 10 mM HEPES zugesetzt. Alternativ wurden bei den Kultivierungsversuchen über 24 h die hCMEC/D3 Zellen in EGM-2 unter Verwendung eines semipermeablen Verschlusses einer 75 cm^2 großen Zellkulturflasche im Zellkulturinkubator kultiviert. Hierzu mussten die Spritzenpumpen außerhalb des Zellkulturinkubators platziert und längere Verbindungsschläuche verwendet werden, da anderenfalls ein zu hoher Wärmeanstieg bei den Pumpen beobachtet wurde. In einem Versuchsaufbau konnten vier DynaMiTES gleichzeitig dynamisch kultiviert werden. Aufgrund des Fassungsvermögens der Spritzen wurde das Zellkulturmedium kontinuierlich für 18,6 h in eine Richtung gepumpt und anschließend wieder zurückgepumpt (Abbildung 14). Als Kontrolle wurden jeweils einige Zellkultureinsätze unter vergleichbaren Bedingungen in einer statischen 12-Well-Platte kultiviert.

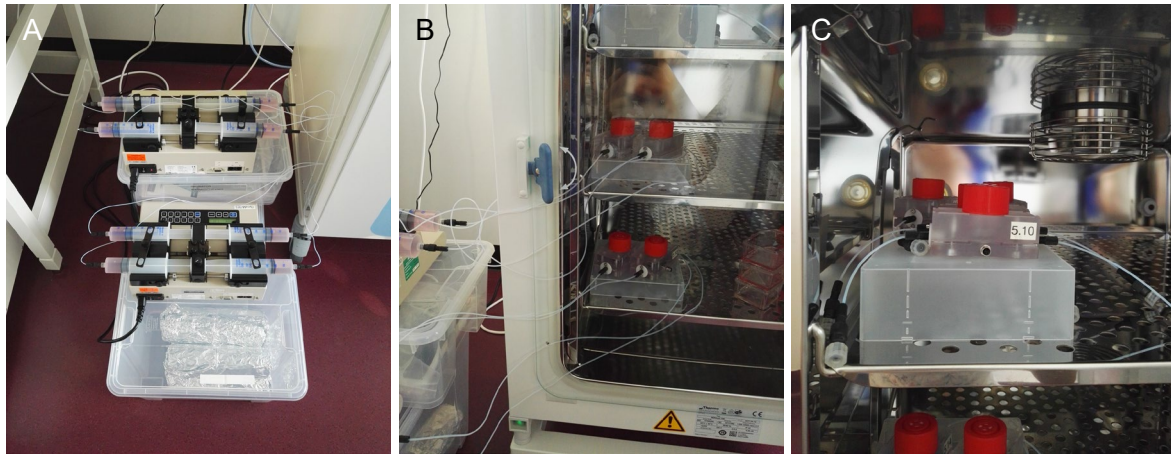


Abbildung 14: Versuchsaufbau bei einer Kultivierungszeit länger als 24 h: Platzierung der Schlauchpumpen neben dem Inkubator (A), dynamisch kultivierte DynaMiTES im Inkubator an die Schlauchpumpen angeschlossen und mit Flaschendeckeln verschlossen (B), statisch kultivierte DynaMiTES im Inkubator mit Flaschendeckeln verschlossen (C)

Im Rahmen eines Experiments wurden die besiedelten Zellkultureinsätze 6 h nach der Zellaussaat in das DynaMiTES eingesetzt und sieben Tage statisch im Zellkulturinkubator kultiviert. Die Kontrollzellen wurden analog dazu in der 12-Well-Zellkulturplatte kultiviert. Innerhalb dieses Zeitraums wurde das Medium täglich gewechselt, um eine Unterversorgung mit Medium zu vermeiden. Die untere Ebene mit den integrierten Elektroden wurde durch eine transparente Ebene ohne Elektroden ausgetauscht. Somit war ein Mikroskopieren innerhalb der Kultivierungszeit ohne eine Beeinflussung der Zellen möglich.

3.2.8.3 Direkte Zelleinsaat ins DynaMiTES

Um den Einsetzprozess zu umgehen, wurde zunächst der unbesiedelte Zellkultureinsatz in die mittlere DynaMiTES-Ebene eingeführt und erst im Anschluss MDCK Zellen mit einer Zelldichte von $8,9 \cdot 10^4$ Zellen/cm² auf die Membran ausgesät. Für die Sicherstellung einer sterilen Umgebung mit ausreichender Nährstoffversorgung wurde diese Ebene in eine 115 cm² großen Zellkulturflasche mit verschließbarem Deckel eingeführt und kultiviert (Abbildung 15). Nach vier Tagen wurden die Zellkultureinsätze entweder herausgenommen und mit Hilfe der STX2®-Elektrode vermessen oder mit den anderen Ebenen zu einem vollständigen DynaMiTES zusammengebaut. Bei Letzterem wurden die Zellen entweder direkt wieder herausgenommen und untersucht oder für weitere 3 h im DynaMiTES kultiviert.

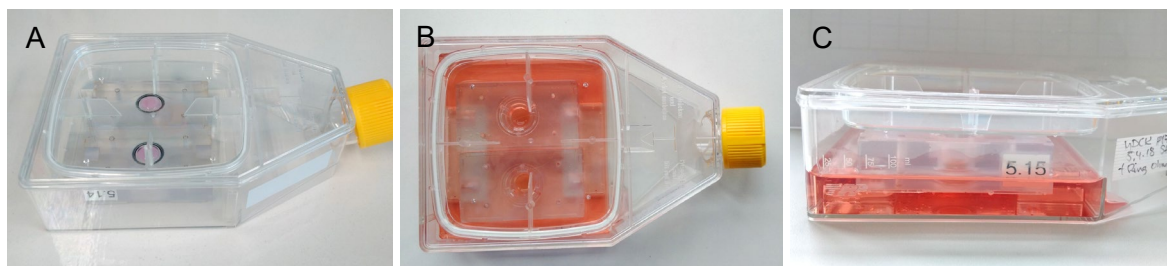


Abbildung 15: Inversen Einsaat der MDCK Zellen direkt in die mittlere Ebene (A) und die weitere Kultivierung in einer Zellkulturflasche von der Aufsicht (B) und der Seitenansicht (C); damit die Zellen bei der inversen Kultivierung den Flaschenboden nicht berühren, wurden die mittleren Ebenen auf sterilen Objektkammerdeckeln platziert (B, C).

3.2.8.4 Kultivierungsbedingungen weiterer Zelllinien

Die folgende Tabelle stellt die Zelllinien und ihre jeweiligen Kultivierungsbedingungen dar, die ebenfalls für eine Kultivierung im DynaMiTES verwendet wurden.

Tabelle 17: Übersicht über die Kultivierungsbedingungen verschiedener Barrieremodelle im DynaMiTES

Zelllinie	Kultivierungsbedingungen
Endotheliale Zelllinie	
cEND	Statische und dynamische Kultivierung ab Tag 4; Zellkultureinsätze mit 0,5 % Gelatine-Lösung beschichtet; $1,3 \cdot 10^5$ Zellen/cm ² in CO ₂ -IDM mit 2 mM L-Glutamin, 10 % (V/V) FKS, 1 % (V/V) Antibiotika/Antimykotika-Lösung und 2 % (V/V) MEM-Vitamin
Epitheliale Zelllinie	
MDCK	Statische und dynamische Kultivierung ab Tag 3 bis 5; $8,9 \cdot 10^4$ Zellen/cm ² in CO ₂ -IDM mit 2 mM L-Glutamin, 10 % (V/V) FKS und 1 % (V/V) Antibiotika/Antimykotika-Lösung; alternativ auch in KRB oder in MDCK-MEM
Caco-2	Statische Kultivierung ab Tag 12; Zellkultureinsätze mit 0,5 % Gelatine-Lösung beschichtet; $8,9 \cdot 10^4$ Zellen/cm ² in CO ₂ -IDM mit 10 % (V/V) FKS, 2 mM L-Glutamin, und 1 % (V/V) Antibiotika/Antimykotika-Lösung

3.2.8.5 Untersuchung der Zellviabilität

Zur Untersuchung des Einflusses einer DynaMiTES-Kultivierung auf die Zellen, wurde die Zellviabilität mit Hilfe verschiedener Testmethoden untersucht. Hierbei kamen die Lebend/Tot-Färbung, die Trypanblaufärbung und die Zellzählung sowie der MTT-Assay zum Einsatz. Zunächst wurden die Zellen, wie im Abschnitt 3.2.8.1 beschrieben, im DynaMiTES kultiviert. Anschließend wurden die Zellkultureinsätze aus dem DynaMiTES vorsichtig mit einer Pinzette herausgenommen und in eine 12-Well-Zellkulturplatte überführt. Das anschließende Vorgehen wird in den folgenden Abschnitten erläutert.

3.2.8.5.1 Lebend/Tot-Färbung

Bei der Lebend/Tot-Färbung handelt es sich um eine Vitalitätsanalyse basierend auf den zwei Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst 33342 und Propidiumiodid (PI) sowie dem Acetomethoxyderivat Calcein (Calcein AM). Hoechst 33342 ist ein zellpermeables Bisbenzimid, das sich in die DNA vorzugsweise im Bereich des Adenin-Thymins einlagert und eine blaue Fluoreszenz aufweist. Der gebundene Farbstoff wird durch ultraviolettes Licht mit einer Wellenlänge von 350 nm angeregt und emittiert Licht von 461 nm Wellenlänge. Propidiumiodid ist ein membranundurchlässiger DNA-Farbstoff, der Zellen mit geschädigter Zellmembran farbig markiert. Das Anregungsmaximum von gebundenen Propidiumiodid beträgt 535 nm und das Emissionsmaximum der roten Fluoreszenz 617 nm. Der dritte Farbstoff, Calcein AM, ist ein nicht fluoreszierender und membrangängiger Markierungsfarbstoff für Lebendzellen. Nach dem Eindringen in die Zellen hydrolysieren interzelluläre Esterase-Enzyme die Acetoxymethylester-Gruppe und Calcium bindet an Calcein. Das Calcium-bindende Calcein hat ein Anregungsmaximum von 495 nm und ein Emissionsmaximum von 515 nm. Die hCMEC/D3 Zellen wurden in Zellkultureinsätzen eingesät und kultiviert (Abschnitt 3.2.7.1), mit KRB gewaschen und mit 0,2 ml Farbstofflösung bestehend aus 0,02 mg/ml Hoechst 33342, 0,02 mg/ml Propidiumiodid und 5 μ M Calcein AM für 30 min lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut mit KRB gewaschen und unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die zuvor 10 min mit 0,05 % Triton X-100 behandelt wurden

3.2.8.5.2 Zellzählung und Zellvitalität mittels Trypanblaufärbung

Die Zellzählung und Trypanblaufärbung wurde mit dem ViCell® Analyzer durchgeführt. Trypanblau ist ein Diazofarbstoff, der nur von Zellen mit einer geschädigten Zellmembran aufgenommen und assimiliert wird und daher Auskunft über die Membranintegrität der Zellen gibt. Die Zellmonolayer wurden für 5 min mit 0,05 % Trypsin-EDTA-Lösung bei 37 °C inkubiert und dann mit Hilfe eines Zellschabers von der Membran abgelöst. Die Zellen wurden in eine 12-Well-Zellkulturplatte nach der Zugabe von Zellkulturmedium durch zügiges Pipettieren vereinzelt und im Anschluss mit dem ViCell® Analyzer vermessen. Die Zellsuspension wurde automatisch aufgezogen und im Verhältnis 1:1 mit einer 0,4%igen Trypanblau-Lösung vermischt. Von dieser Zellsuspension wurden mittels digitaler Bildtechnologie 50 Fotos aufgenommen, anhand derer die Zellanzahl pro ml ermittelt und das Verhältnis zwischen gefärbten und ungefärbten Zellen analysiert wurde.

3.2.8.5.3 MTT-Assay

Der MTT-Assay wurde, wie unter 3.2.7.6 beschrieben, durchgeführt.

3.2.8.6 TEER-Untersuchung im DynaMiTES

Das DynaMiTES wurde mit dem EVOM²®-Gerät verbunden und die Messung erfolgte bei einer Frequenz von 12,5 Hz. Gegenüber der herkömmlichen Endohm®-Kammer und der STX2®-Elektrode haben die DynaMiTES-Elektroden den Vorteil, dass die Messung ohne eine Unterbrechung der Kultivierung erfolgen kann. Die ermittelten TEER-Werte im DynaMiTES wurden in einer Vergleichsstudie mit den Ergebnissen der herkömmlichen Elektroden verglichen. Hierfür wurde die MDCK Zelllinie aufgrund ihrer guten Barriereigenschaften verwendet. Zunächst wurde der TEER-Wert eines MDCK Monolayers durch die Endohm®-Kammer und die STX2®-Elektrode ermittelt. Anschließend wurden die Zellkultureinsätze in das DynaMiTES eingebracht, kurz äquilibriert und der TEER-Wert gemessen. Nach dem Herausnehmen aus dem DynaMiTES wurden die TEER-Werte erneut mit der Endohm®-Kammer und der STX2®-Elektrode überprüft. Mögliche Korrosionsschichten auf den Elektroden im DynaMiTES wurden mit Hilfe von Stahlwolle abgeschliffen.

3.2.8.7 Statische und dynamische Permeationsuntersuchungen

Zur Untersuchung der Permeabilität des Blut-Hirn-Schranke-Modells nach einer Kultivierung im DynaMiTES wurden statische und dynamische Permeationsuntersuchungen mit Natriumfluoreszein durchgeführt. Hierfür wurde das Medium aus den DynaMiTES-Kompartimenten entfernt, durch 37 °C warmes KRB ersetzt und 30 min im Tischinkubator äquilibriert. Anschließend wurde KRB wieder entfernt und 1,0 ml frisches KRB in das Akzeptor-Kompartiment eingefüllt. Das Donor-Kompartiment wurde mit einer 25 µg/ml Natriumfluoreszein-Lösung gefüllt.

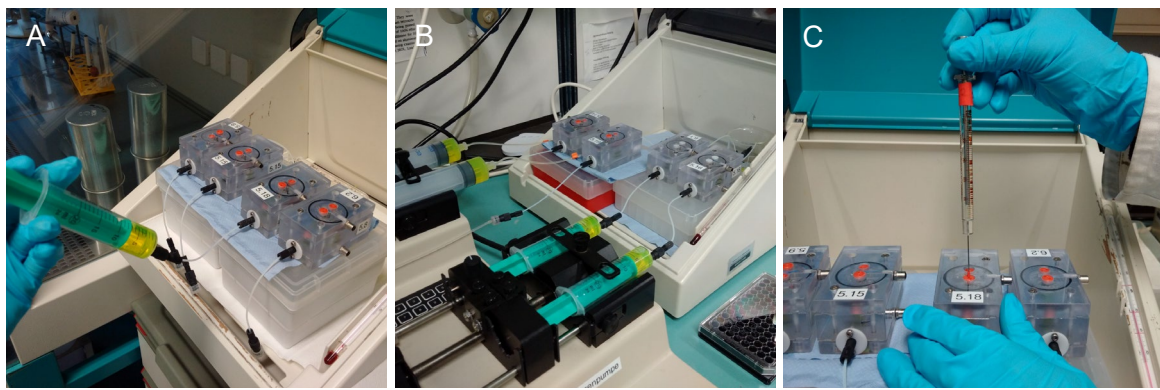


Abbildung 16: Versuchsaufbau der Permeation im DynaMiTES; statischer Permeationsversuch mit händischem Einspritzen der NaF-Lösung (A), dynamischer Permeationsversuch mit einer NaF-Lösung bei einem Fluss von 0,03 ml/min (B) und Probenzug aus dem Akzeptor-Kompartiment (C)

Bei der dynamischen Permeation wurde frische Donor-Lösung mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,03 ml/min durch eine Spritzenpumpe an den Zellen entlang geströmt. Bei der statischen Variation wurde die Donor-Lösung in regelmäßigen Abständen händisch nachgespritzt. Die austretende Donor-Lösung wurde entweder in einem Abfallgefäß aufgefangen oder mit einer weiteren Spritze wieder aufgesaugt. Mit einer Mikroliter-Spritze wurden zu festgelegten Zeitabständen je 100 µl Akzeptor-Lösung entnommen und durch 100 µl KRB ersetzt. An der Kanüle der Mikroliter-Spitze wurde eine Markierung angebracht, um beim Einstechen in das Akzeptor-Kompartiment ein zu tiefes Eindringen und damit einhergehend eine Schädigung der Membran zu verhindern. Die Untersuchungen wurden in einem Tischinkubator bei 37 °C mit einer Versuchsdauer von 120 bis 150 min durchgeführt (Abbildung 16). Die Permeation der Kontrollzellen in der 12-Well-Zellkulturplatte sowie die Auswertung der Probenentnahmen wurden, wie in Abschnitt 3.2.7.5 beschrieben, umgesetzt.

3.2.8.8 Untersuchung von pH und Temperatur

Um den Einfluss einer Zellkultivierung im DynaMiTES auf die Zellumgebung zu untersuchen, wurden der pH-Wert und die Temperatur des Zellkulturmediums bestimmt. Die Temperatur des Mediums im Akzeptor-Kompartiment wurde direkt nach dem Herausnehmen aus dem Zellkulturinkubator und dem Öffnen des DynaMiTES mit einem Infrarot-Thermometer gemessen. Für die pH-Messungen wurde das Medium aus dem DynaMiTES in eine 24-Well-Zellkulturplatte pipettiert und der pH-Wert mit dem pH-Meter FiveEasy Plus® bei einer Raumtemperatur von 23 ± 1 °C ermittelt.

3.2.9 Statistik

Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Die Auswertung der Ergebnisse wurde unter Zuhilfenahme der Software IBM SPSS Statistics 24 (IBM, New York, US) und Microsoft Excel 2010 erstellt.

Bei einem statistischen Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Gruppen wurde nach Überprüfung der Normalverteilung die Ein-Weg-Varianzanalyse (one-way-ANOVA) durchgeführt. Des Weiteren wurden für homogene Varianzen der Bonferroni Post-Hoc-Test und für inhomogene Varianzen der Games-Howell Post-Hoc-Test angewendet. Bei den Auswertungen wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von höchstens 5 % ($p \leq 0,05$) als signifikant bewertet.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Charakterisierung der zerebralen humanen Endothelzelllinie unter Anwendung eines statischen Mono-Kulturmodells

Für die Etablierung eines *in vivo*-ähnlichen Blut-Hirn-Schranke-Modells sind die Eigenschaften der verwendeten Endothelzelllinie entscheidend. Die humane Endothelzelllinie wurde daher zunächst hinsichtlich ihrer Zellmorphologie, ihrer Zellkonfluenz, ihrer Funktionalität und ihrer Proteinexpression relevanter Zell-Zell-Kontakte charakterisiert.

4.1.1 Mikroskopische Untersuchung der Zellmorphologie und Zellkonfluenz

Die Endothelzelllinie hCMEC/D3 wies eine spindelförmige Morphologie auf, die bei einer höheren Zelldichte zu einer polygonalen Form tendierte. Die Zellen bildeten auf den Wachstumsoberflächen der Zellkulturflaschen und der Zellkultureinsätze einen konfluenten Zellmonolayer aus (Abbildung 17, A). Eine vollständige Konfluenz wurde ebenso in histochemischen Untersuchungen (Abschnitt 3.2.7.3) durch die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (HE) beobachtet (Abbildung 17, B).

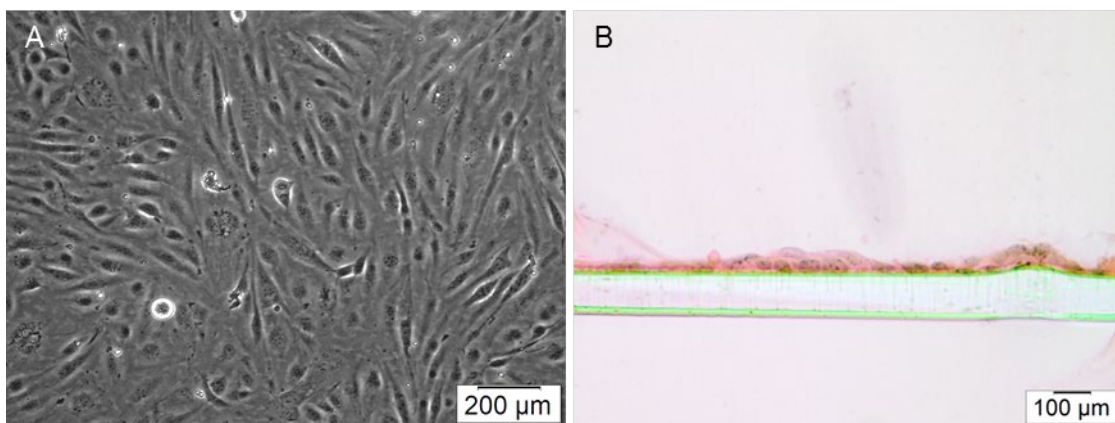


Abbildung 17: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahme von hCMEC/D3 Zellen an Tag 4 (A) und HE-Färbung im Querschnitt von eingebetteten hCMEC/D3 Zellen an Tag 7

4.1.2 Funktionalität der hCMEC/D3 Zelllinie

Zur Ermittlung der Funktionalität der Endothelzelllinie wurden die angiogenetischen Eigenschaften mittels *endothelial tube formation assay* und die Barriereintegrität mittels TEER-Messungen und Permeationsstudien untersucht. Die mikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 18 zeigen die Entwicklung der Endothelzellen auf Matrigel™ über einen Zeitraum von 18 h. Entsprechend den Erwartungen sind zunächst vereinzelte Zellen (A) zu sehen, die nach 3 h Zellagglomerate ausbilden (B). Nach 18 h sind aufgrund der angiogenetischen Eigenschaften von Endothelzellen charakteristische, kapillarähnliche Strukturen (C) zu erkennen (Smith und Staton 2006).

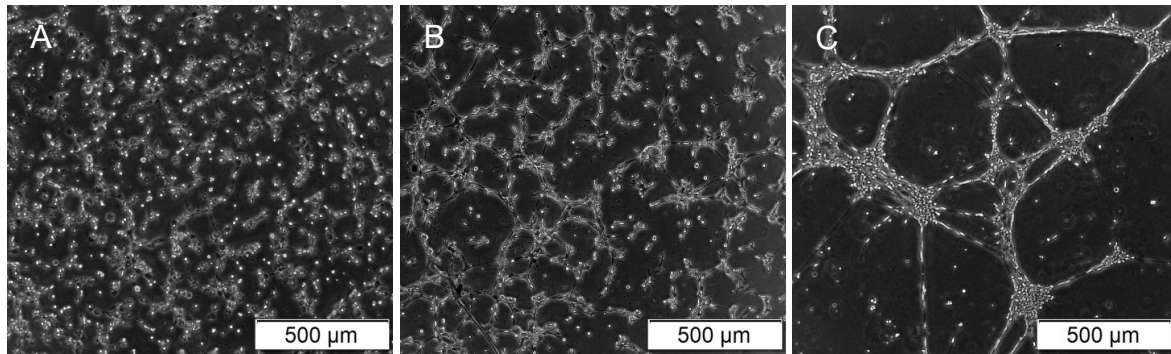


Abbildung 18: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von hCMEC/D3 Zellen nach: 1,5 h (A), 3 h (B) und 18 h (C) Inkubation auf Matrigel™

Der TEER-Wert der hCMEC/D3 Zellen in Greiner® Zellkultureinsätzen betrug am ersten Tag $4,4 \pm 1,6 \Omega \cdot \text{cm}^2$ und stieg beim Erreichen der Konfluenz am dritten Tag auf $13,7 \pm 1,6 \Omega \cdot \text{cm}^2$ an (Abbildung 19). Üblicherweise werden die TEER-Werte eines Endothelzell-Monolayers innerhalb eines Zeitraumes von sieben bis zehn Tagen ermittelt (Strazza et al. 2016; Griep et al. 2013; Poller et al. 2008). Dieser Zeitraum wurde für die vorliegende Arbeit aufgrund des niedrigen ermittelten TEER-Niveaus auf 27 Tage erweitert. Jedoch zeigte sich auch bei der Langzeitmessung keine wesentliche Veränderung, abgesehen von einem leichten Anstieg an Tag 15 auf $17,1 \pm 2,2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Abbildung 19). Dieser geringe TEER-Anstieg könnte durch Messschwankungen oder durch ein mögliches überlagertes Zellwachstum verursacht worden sein. Das Auftreten eines überlagerten Zellwachstums ist in der Literatur ab dem zehnten Versuchstag beschrieben (Urich et al. 2012), konnte jedoch in den vorliegenden Untersuchungen bis zum Tag 12 mikroskopisch ausgeschlossen werden.

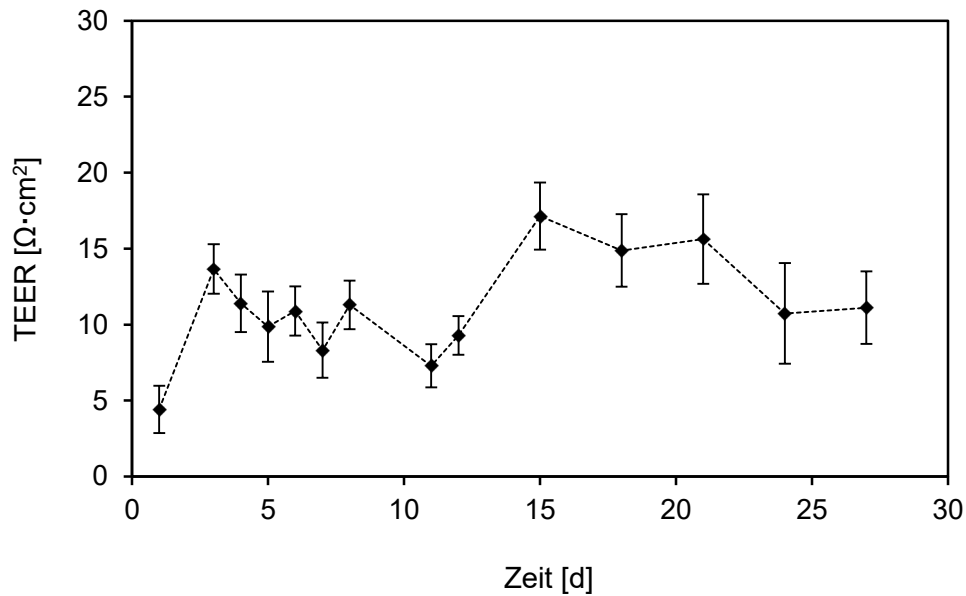


Abbildung 19: TEER-Verlauf eines hCMEC/D3 Monolayers über einen Zeitraum von 27 Tagen ($n = 6 - 12$); $M \pm SD$

Da die verlängerte Kultivierungsdauer hinsichtlich des TEER-Wertes keinen Vorteil brachte und außerdem das Risiko eines überlagerten Zellwachstums bestand, wurden in den nachfolgenden Untersuchungen die Barriereigenschaften innerhalb von zehn Tagen nach der Zellaussaat ermittelt.

Zur Beurteilung der Permeationsbarriere wurden Permeationsuntersuchungen über einen Zeitraum von 120 min durchgeführt (Abschnitt 3.2.7.5). Der Permeationskoeffizient durch den hCMEC/D3 Zellmonolayer unterschied sich mit einer Differenz von $2,03 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ nur geringfügig von dem durch die Zellkultureinsätze ohne Zellen (Tabelle 18). Einhergehend mit den TEER-Ergebnissen weisen die Permeationsuntersuchungen auf eine schwach ausgeprägte Barriereintegrität der hCMEC/D3 Zellen hin.

Tabelle 18: Fluxdaten und Permeationskoeffizienten für die Permeation von Natriumfluoreszein durch einen hCMEC/D3 Monolayer an Tag 7 und durch einen Zellkultureinsatz ohne Zellen ($n = 4 - 8$); $M \pm SD$

Permeationsmodell mit 25 $\mu\text{g/ml}$ NaF	Flux $J [\cdot 10^{-4} \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{s}]$	Permeationskoeffizient $P_{\text{app}} [\cdot 10^{-6} \text{ cm/s}]$
hCMEC/D3	$1,02 \pm 0,13$	$4,07 \pm 0,51$
Zellkultureinsatz ohne Zellen	$1,52 \pm 0,10$	$6,10 \pm 0,41$

4.1.3 Lokalisationsanalyse der TJ-Proteine

Zur Lokalisation des Endothelmarkers vWF sowie der Zell-Zell-Kontaktproteine VE-Cadherin, Occludin, ZO-1 und Claudin-5 wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt (Abschnitt 3.2.5). Das Markerprotein vWF wurde intrazellulär in den Weibel-Palade-Körperchen exprimiert (Abbildung 20) und die endothelzellspezifische Adhärenzverbindung VE-Cadherin zeigte eine kontinuierliche Fluoreszenzfärbung an den Zell-Zell-Kontakten (Abbildung 21, A). Das TJ-assoziierte Protein ZO-1 hingegen wurde als eine schwache, diffuse Färbung im Zytoplasma nachgewiesen und befand sich nur in wenigen Bereichen an den Zellgrenzen (Abbildung 21, B). Weiterhin wurden die TJ-Proteine Occludin und Claudin-5 nicht wie erwartet intramembranös exprimiert. Occludin wies eine starke intrazelluläre Fluoreszenz auf (Abbildung 21, C) und Claudin-5 zeigte sich teilweise als eine vesikuläre Markierung um den Zellkern (Abbildung 21, D). Diese war eher schwach ausgeprägt und ging einher mit einer hohen Hintergrundfärbung. Bei den Proben ohne einen Sekundärantikörper (Negativkontrollen) wurde keine unspezifische Färbung der Zellen beobachtet (nicht dargestellt). Zur Überprüfung der verwendeten Antikörper wurden jeweils Positivkontrollen durchgeführt (Anhang 9.1).

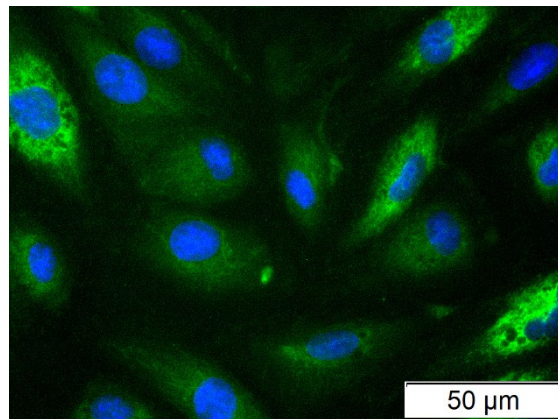


Abbildung 20: Mikroskopische Aufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen der Zelllinie hCMEC/D3; die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt (blau) und der sekundäre Antikörper vWF war mit FITC konjugiert (grün).

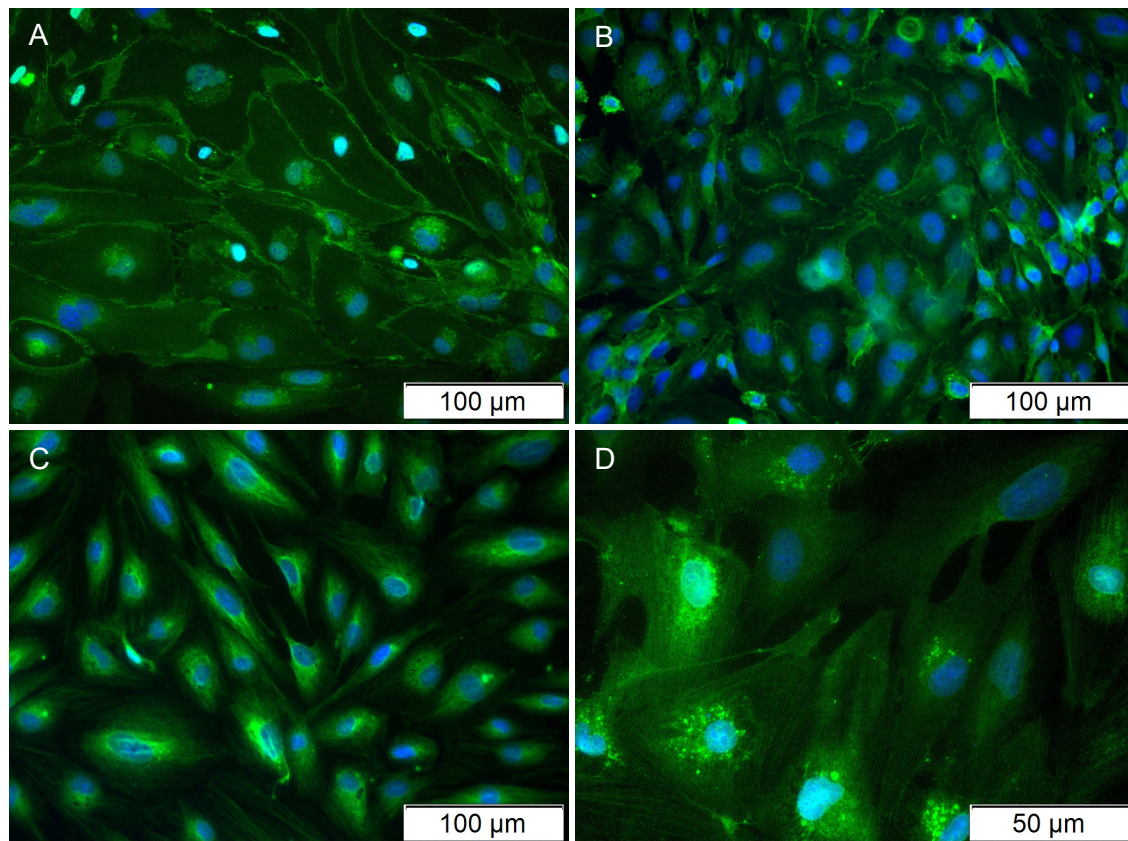


Abbildung 21: Mikroskopische Aufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen der Zelllinie hCMEC/D3; die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt (blau) und die jeweiligen sekundären Antikörper waren mit FITC konjugiert (grün): VE-Cad (A), ZO-1 (B), Occludin (C), Claudin-5 (D).

4.1.4 Zusammenfassende Diskussion zur Charakterisierung der zerebralen Endothelzelllinie hCMEC/D3

Die humane Endothelzelllinie hCMEC/D3 zeigte eine charakteristische spindelförmige Morphologie und bildete auf Matrigel™ kapillarartige Strukturen aus. Diese Beobachtungen sind mit denen von Primärkulturen humaner zerebraler Endothelzellen und mit vorangegangenen Studien mit der hCMEC/D3 Zelllinie vergleichbar (Weksler et al. 2005; Dorovini-Zis et al. 1991). Darüber hinaus wuchsen die Endothelzellen in einem konfluenten Monolayer, der für die Bildung einer restriktiven Barriere entscheidend ist. Dennoch befand sich der gemessene TEER-Wert in der Langzeitstudie in einem Bereich unter $20 \Omega \cdot \text{cm}^2$ und ist damit als niedrig einzustufen (Deli et al. 2005; Gaillard und de Boer 2000). Die Werte korrelieren mit den Ergebnissen früherer Studien, bei denen ein TEER von 2 bis $15 \Omega \cdot \text{cm}^2$ beschrieben ist (Biemans et al. 2017; Al-Shehri et al. 2015; Eigenmann et al. 2013). Andere Studien erreichten unter den herkömmlichen Bedingungen als Mono-Kulturmodell höhere

TEER-Werte zwischen 30 und 100 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (Chen et al. 2015; Liu et al. 2014; Daniels et al. 2013; Schrade et al. 2012; Hatherell et al. 2011; Förster et al. 2008; Weksler et al. 2005). In dieser Arbeit weist neben den niedrigen TEER-Werten auch der Permeationskoeffizient von Natriumfluoreszein mit ungefähr $4 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ auf eine geringe Barriereintegrität der hCMEC/D3 Zellen hin. Helms et al. stellten dar, dass Endothelzellen mit niedrigen TEER-Werten bei einer Permeation von Luzifer Yellow, Natriumfluoreszein oder Saccharose Permeationskoeffizienten von $2 - 19 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ aufwiesen, wohingegen Endothelzellen mit hohen TEER-Werten Permeationskoeffizienten von $0,8 - 3 \cdot 10^{-6} \text{ cm/s}$ erreichten (Helms et al. 2016).

Eine Ursache für die in den Versuchen festgestellte geringe Barrierefunktionalität ist die unvollständige Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte. So liegen die TJ-Proteine ZO-1, Occludin und Claudin-5 überwiegend zytosolisch verteilt vor. Vorherige Studien stellten die Relevanz von ZO-1 und Claudin-5 für die Barriereigenschaften ausführlich dar (Haseloff et al. 2015; Luissint et al. 2012; Nitta et al. 2003). Auch die Expression von Occludin korreliert mit dem Grad der Barriereintegrität (Hirase et al. 1997), obwohl Occludin an der Bildung der funktionellen TJs nicht direkt beteiligt ist (Saitou et al. 1998).

4.2 Untersuchung diverser statischer Kultivierungsvariationen der humanen Endothelzelllinie hCMEC/D3

Die Untersuchungen in Abschnitt 4.1 zeigten, dass die Endothelzelllinie nur eine geringe Barriereintegrität aufwies und wichtige Zell-Zell-Kontaktproteine kaum bzw. unvollständig exprimiert wurden. Mit dem Ziel die Barriereeigenschaften zu verbessern, wurde im Folgenden der Einfluss verschiedener Kultivierungsvariationen untersucht. Hierbei wurden verschiedene Zellkulturmedien (Abschnitt 4.2.1), Medienzusätze, Beschichtungsmaterialien, Zellkultureinsätze und Zellarrangements (Abschnitt 4.2.2) sowie dynamische Kultivierungsbedingungen (Abschnitt 4.4) betrachtet.

4.2.1 Einfluss von Zellkulturmedien auf die Wachstums- und Barriereeigenschaften

Das Zellkulturmedium stellt eine wichtige Basis für eine adäquate Zellproliferation und -differenzierung dar. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die Endothelzellen in zehn verschiedenen Basalmedien kultiviert und ihr Anheftungsvermögen, ihr Wachstumsverhalten und ihre Barriereintegrität gegenüber den Zellen im Standardmedium EGM-2 verglichen. Hierbei wurden die gängigen Zellkulturmedien DMEM, Ham's F-12, DMEM/Ham's F-12, M199 und RPMI 1640 sowie die auf Endothelzellen spezialisierten Medien MCDB 131 und ECGM MV 2 jeweils mit einem Serumanteil von 2,4 % untersucht. Fetales Kälberserum besteht aus diversen Bestandteilen, wie z. B. Wachstumsfaktoren, Hormonen, Vitaminen sowie Bindungs- und Transportproteinen. Es ist ein häufiger Bestandteil von Zellkulturmedien und nimmt u. a. Einfluss auf die Zelladhäsion, Zellproliferation, die Pufferkapazität und die Medienviskosität. Außerdem hat es osmotische Effekte und es stoppt die Reaktion mit Trypsin beim Subkultivieren der Zellen. Neben den ethischen Aspekten ist die komplexe und undefinierte Zusammensetzung, die von Charge zu Charge variieren kann, ein Nachteil (Hoshiba et al. 2018; van der Valk et al. 2010; Freshney 2010). Im Hinblick auf ein reproduzierbares und standardisiertes Zellkulturmodell wird daher eine serumfreie Kultivierung als sinnvoll erachtet.

Weitere Studien haben zudem festgestellt, dass Serum und einige Wachstumsfaktoren die TJ-Bildung zwischen den Endothelzellen verhindern und somit die Barriereintegrität schwächen (Nitz et al. 2003). In der Literatur werden bereits diverse Blut-Hirn-Schranke-Modelle beschrieben, die ab der Konfluenz nach einer anfänglichen Serumsupplementation unter serumfreien Bedingungen fortgeführt werden (Patabendige et al. 2013b; Brown et al. 2007; Franke et al. 1999; Hoheisel et al. 1998). Relativ wenige Studien beschäftigen sich hingegen mit der serumfreien Kultivierung von zerebralen Endothelzellen über einen längeren Kultivierungszeitraum. Aus diesen Gründen wurden bei den vorliegenden Kultivierungsuntersuchungen auch die serumfreien Medien hESFM und SF ECM berücksichtigt. Eine Übersicht aller Medienvariationen ist in Abschnitt 3.2.1.3.1 dargestellt.

Endothelzellen proliferieren nur, wenn sie sich zuvor an der Wachstumsoberfläche angeheftet und ausgebreitet haben. Dieser Prozess ist abhängig von zweiwertigen Kationen und Adhäsionsfaktoren, die z. B. im Serum vorhanden sind (Freshney 2010). Nach 2,5 h zeigte die hCMEC/D3 Zelllinie in ihrem Anheftungsverhalten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kultivierungsvariationen. Zudem wurden zur Beurteilung der Proliferation Wachstumskurven aufgenommen. Aus diesen lassen sich die Latenzphase (lag-Phase), die PDT und die Sättigungsdichte ermitteln (Abschnitt 3.2.2). Die Latenzphase der hCMEC/D3 Zellen betrug in EGM-2 1,1 Tage und ist vergleichbar mit den Latenzphasen in Ham's F-12, DMEM/Ham's F-12, MCDB 131 und ECGM MV 2. Die Zellen benötigen diese Zeit, um sich an die Zellkulturoberfläche anzuheften und Enzyme sowie DNA zu synthetisieren. Im Gegensatz dazu wiesen die Zellen in DMEM, M199, RPMI 1640, in hESFM und SF ECM ein verlängertes Anpassungsverhalten auf. Weitere Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellkulturmedien zeigten sich in der Sättigungsdichte der Zellen. Zellen in EGM-2 erreichten eine Sättigungsdichte von $9,3 \cdot 10^5$ Zellen/cm², die vergleichbar mit MCDB 131, ECGM MV-2 und hESFM ist. Eine leicht geringere Sättigungsdichte wurde für die Zellen in Hams F-12, DMEM/Hams F-12, SF ECM beobachtet und eine stark reduzierte in DMEM, M199 und RPMI 1640. Eine Auflistung der ermittelten Wachstumsparameter ist in Tabelle 19 dargestellt. Die mikroskopische Untersuchung der Zellmorphologie ließ keine Unterschiede innerhalb der verschiedenen Medien erkennen (Daten nicht dargestellt).

4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 19: Die Anheftungseffizienz AE ($n = 4 - 17$; $M \pm SD$), die lag-Phase, die Populationsverdopplungszeit PDT, die Sättigungsdichte ($n = 3 - 13$) und der TEER-Wert ($n = 3 - 8$; $M \pm SD$) der hCMEC/D3 Zellen nach einer Kultivierung in zehn unterschiedlichen Zellkulturmedien; der Mittelwert (M) der TEER-Ergebnisse wurde innerhalb der Kultivierungszeit nach dem Erreichen eines konfluenten Monolayers ermittelt. # = nicht konfluent

Zellkulturmedium	AE [%]	lag-Phase [d]	PDT [d]	Sättigungsdichte [Zellen/cm ²]	M TEER [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]
Mit 2,4 % Serum					
EGM-2	84,4 \pm 6,2	1,1	1,4	9,3 $\cdot 10^5$	12,4 \pm 0,8
DMEM	83,8 \pm 4,9	3,7	1,2	2,0 $\cdot 10^5$	6,2 \pm 1,7#
Ham's F-12	89,2 \pm 3,7	0,7	1,2	5,8 $\cdot 10^5$	12,9 \pm 1,1
DMEM/F-12	84,8 \pm 13,2	1,1	1,1	6,8 $\cdot 10^5$	12,7 \pm 1,0
M199	81,1 \pm 7,5	1,5	-	1,3 $\cdot 10^5$	13,4 \pm 1,0
RPMI 1640	79,0 \pm 7,2	1,9	1,2	4,8 $\cdot 10^5$	11,9 \pm 2,4
MCDB 131	82,5 \pm 3,5	0,8	1,2	9,2 $\cdot 10^5$	12,6 \pm 3,4
ECGM MV-2	83,8 \pm 3,3	0,9	1,1	1,1 $\cdot 10^6$	13,8 \pm 0,3
Serumfrei					
hESFM	87,6 \pm 3,5	1,5	1,0	7,9 $\cdot 10^5$	13,2 \pm 3,4
SF ECM	78,4 \pm 3,0	1,9	1,6	5,4 $\cdot 10^5$	12,2 \pm 1,3

Die Versuchsauswertung verdeutlicht, dass die Endothelzellen in DMEM, M199 und RPMI 1640 ein reduziertes Wachstum aufwiesen. Darüber hinaus ergab die Untersuchung, dass eine serumfreie Kultivierung möglich ist. Die unterschiedlichen Medienzusammensetzungen hatten jedoch keinen Einfluss auf die Barriere-eigenschaften. Die TEER-Werte befanden sich weiterhin in einem Bereich von 11,9 \pm 2,4 bis 13,8 \pm 0,3 $\Omega \cdot \text{cm}^2$. Eine Ausnahme stellten die Zellen in DMEM dar, da sie innerhalb des untersuchten Zeitraumes keinen konfluenten Zellmonolayer ausbildeten (Tabelle 19).

Für die Wachstumsversuche wurden die Zellen in den Passagen 28 bis 35 verwendet. Bei einer Wachstumsanalyse in höheren Passagenzahlen (≥ 40) wurde ein veränderter Wachstumskurvenverlauf mit einer deutlich höheren Sättigungsdichte festgestellt. Ähnliche passagenabhängige Effekte auf das Wachstumsverhalten sind auch bei anderen Zelllinien, wie z. B. der Caco-2 Zelllinie, bekannt (Hughes et al. 2007; Briske-Anderson et al. 1997). Aufgrund von Literaturempfehlungen und einer besseren Vergleichbarkeit wurden diese Ergebnisse nicht mit einbezogen (Weksler et al. 2005).

4.2.1.1 Quantitative Untersuchung der Genexpression von TJ-Proteinen in Abhängigkeit von den Kultivierungsmedien

Der Einfluss der Zellkulturmedien auf die mRNA-Expression der Zellen wurde mittels qRT-PCR untersucht (Abschnitt 3.2.6). Hierbei wurde die Genexpression der Zell-Zell-Kontaktproteine Claudin-5 (CLDN5), ZO-1 (TJP1), VE-Cadherin (CDH5) und Occludin (OCLN) betrachtet. Die qRT-PCR-Produkte der im Standardmedium EGM-2 kultivierten Endothelzellen wurden mittels einer Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Das dazugehörige Fragmentmuster ist in Abbildung 22 dargestellt.

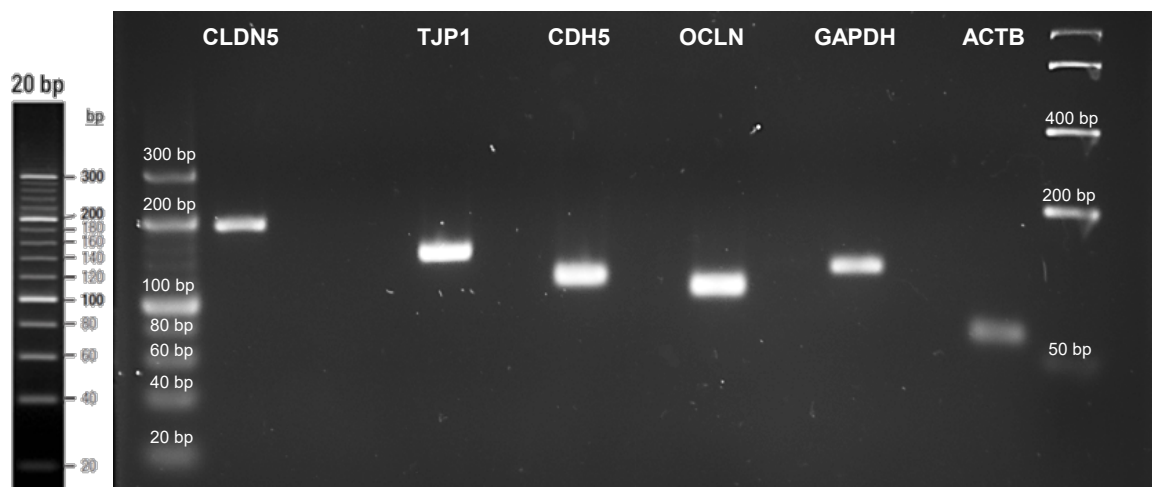


Abbildung 22: Gelelektrophoreseaufnahme der PCR-Produkte aus der qRT-PCR der hCMEC/D3 Zellen in einem 4%igen Agarosegel; von links nach rechts: *O'RangeRuler™* 20 bp (Herstellerabbildung und eigene Auftrennung im Vergleich), CLDN5 (186 bp), TJP1 (142 bp), CDH5 (112 bp), OCLN (101 bp), GAPDH (117 bp), ACTB (62 bp) und *FastRuler™* low range; die jeweiligen Negativkontrollen (NTC = *no template control*) waren alle negativ. bp = *base pair* (Basenpaare)

Da die Zellkulturmedien DMEM, M199 und RPMI 1640 ein unzureichendes Zellwachstum verursachten (Abschnitt 4.2.1), wurden diese bei der Expressionsanalyse nicht berücksichtigt. Die Auswertung erfolgte anhand der normalisierten relativen Genexpression (*normalized relative quantity*, NRQ), bezogen auf das Standardmedium EGM-2 (Abschnitt 3.2.6.3). Unterschiede in der Genexpression wurden ab einer zweifachen Veränderung als biologisch relevant gewertet, was einer NRQ unter 0,5 und über 2,0 entsprach. Mehrheitlich befand sich die Genexpression der untersuchten Kontaktproteine in einem NRQ-Bereich von 0,5 bis 1,2 und nur marginale Unterschiede waren hinsichtlich der Genexpression erkennbar (Abbildung 23). Ausnahmen bildeten die Markergene CDH5 (NRQ = 0,4) und OCLN (NRQ = 2,1) im Medium hESFM und TJP1 (NRQ = 0,3) in DMEM/F 12.

Darüber hinaus schien in einigen Zellkulturmedien die Genexpression von Claudin-5 im Vergleich zu dem Standardmedium geringer auszufallen. Diese Ergebnisse sind jedoch mit Vorsicht zu interpretieren. Die Schwellenwert-Zyklen von Claudin-5 befanden sich in einem hohen Bereich ($Ct \sim 30$) und innerhalb der Schmelzkurvenanalysen zeigten sich Primer-Dimere. Beides spricht für eine sehr geringe Genexpression und erschwert die Interpretation der Ergebnisse.

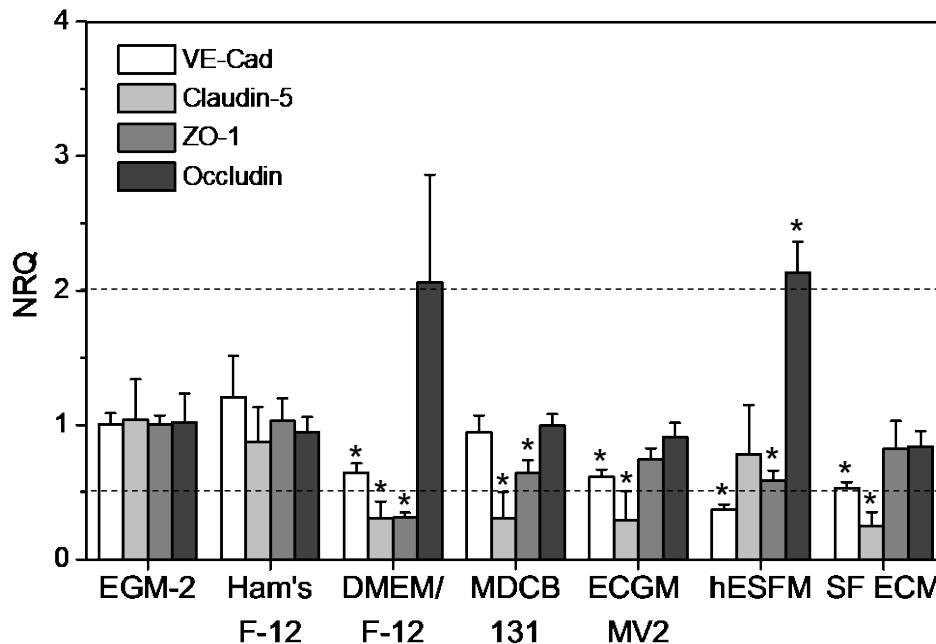


Abbildung 23: Darstellung der normalisierten relativen Menge (NRQ) der Markergene CDH5, ZO-1, OCLN und CLN5 der hCMEC/D3 Zelllinie nach der Kultivierung in verschiedenen Basalmedien; eine NRQ niedriger 0,5 oder höher 2,0 wurde als biologisch relevanter Schwellenwert deklariert (dargestellt als gestrichelte Linie). Die Referenzgene waren humanes ACTB und GAPDH und die Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. (n = 3 – 6); $M \pm SD$; * $p < 0,05$ im Vergleich zum Standardmedium EGM-2

4.2.2 Einfluss weiterer Kultivierungsbedingungen auf die Barriere-eigenschaften

Neben den Zellkulturmedien wurde der Einfluss von Zellkultureinsätzen, Mediensupplementen, Beschichtungsmaterialien und Ko-Kultivierungsvarianten auf die TEER-Werte der Endothelzelllinie untersucht. Die Medienzusätze Hydrocortison, Serum, Calcium und pCPT-cAMP mit Ro-20-1724 haben alle bekanntermaßen einen Einfluss auf die Barriere (Furihata et al. 2015; Wong et al. 2010; Förster et al. 2008; Wilhelm et al. 2007; Hoheisel et al. 1998). Die aus diesen Untersuchungen resultierenden mittleren TEER- und mittleren maximalen TEER-Werte sind in Tabelle 20 aufgeführt.

Tabelle 20: TEER-Werte von hCMEC/D3 unter variierenden Kultivierungsbedingungen: Porengröße (0,4, 0,1, 3,0 μm ; $n = 5 - 6$), Medienzusätze (Serum, Hydrocortison, cAMP + Ro und Calcium; $n = 4 - 8$), Beschichtungsmaterial (ohne Beschichtung, Kollagen I, Kollagen G, Kollagen IV, Fibronectin, Laminin und Kombinationen; $n = 3$) sowie Zellarrangement (hCMEC/D3 und SVGmm als Mono-Kultur sowie direkte und indirekte Ko-Kultur; $n = 4 - 8$); (M) TEER-Mittelwert nach dem Erreichen eines konfluenten Monolayers, (M TEER_{max}) Mittelwert der höchsten TEER-Werte und der dazugehörige Zeitpunkt; $M \pm SD$; * $p < 0,05$ im Vergleich zur ersten Zeile des jeweiligen Abschnitts bzw. bei den Zellarrangements zu den jeweiligen hCMEC/D3-Mono-Kulturen

Kultivierungsbedingungen	TEER $M [\Omega \cdot \text{cm}^2]$	TEER _{max} $M [\Omega \cdot \text{cm}^2]$	Zeit [d]
Porengröße (EGM-2/AM ab Tag 3; Kollagen I)			
hCMEC/D3 auf 0,4 μm PET, ThinCert™	15,1 \pm 1,9	17,2 \pm 2,2	6
hCMEC/D3 auf 1,0 μm PET, ThinCert™	8,6 \pm 0,3*	9,0 \pm 0,6*	7
hCMEC/D3 auf 3,0 μm PET, ThinCert™	13,4 \pm 1,9	16,0 \pm 2,0	7
Medium und Zusätze (Kollagen I, 0,4 μm ThinCert™)			
EGM-2 ab der Einsaat	14,4 \pm 2,0	16,6 \pm 0,7	7
AM ab der Einsaat	15,2 \pm 1,8	17,2 \pm 2,1	7
AM ohne Serum ab Tag 1	11,7 \pm 1,7	13,0 \pm 1,5	3
AM ohne Serum ab Tag 3	12,4 \pm 0,5	12,8 \pm 1,3	2
AM mit 0,25 % Serum ab der Einsaat	12,2 \pm 1,8	13,6 \pm 1,9	2
AM mit 5 % Serum ab der Einsaat	13,7 \pm 0,4	14,1 \pm 0,9	2
AM mit 10 % Serum ab der Einsaat	14,4 \pm 1,3	16,4 \pm 0,9	2
AM ohne Hydrocortison ab der Einsaat	13,0 \pm 1,1	14,4 \pm 0,5	3
AM mit 550 nM Hydrocortison ab Tag 1	15,5 \pm 1,3	17,2 \pm 2,8	2
AM mit 550 nM Hydrocortison ab Tag 3	15,4 \pm 1,5	17,2 \pm 1,1	3
AM mit 1000 nM Hydrocortison ab Tag 1	15,0 \pm 0,8	16,4 \pm 1,4	3
AM mit 1000 nM Hydrocortison ab Tag 3	15,7 \pm 1,2	17,0 \pm 1,6	3
AM mit 250 μM pCPT-cAMP und 17.5 μM Ro-20-1724 ab der Einsaat	14,9 \pm 1,3	17,2 \pm 2,1	7
AM mit zusätzlichem 2 mM Calcium ab der Einsaat	12,4 \pm 0,9	13,6 \pm 0,8	5
Beschichtungsmaterial (EGM-2/AM ab Tag 3; 0,4 μm ThinCert™)			
Kollagen I	11,2 \pm 0,2	13,6 \pm 1,1	7
Ohne Beschichtung	11,2 \pm 0,2	20,3 \pm 3,0	7
Kollagen G	13,0 \pm 1,3	14,3 \pm 2,4	7
Kollagen IV	7,2 \pm 0,1	9,0 \pm 2,0	7
Fibronectin	14,3 \pm 0,4	15,4 \pm 2,9	4
Kollagen IV + Fibronectin	7,9 \pm 0,3	9,8 \pm 0,7	7
Kollagen IV + Fibronectin + Laminin (5:2:3)	10,4 \pm 0,3	10,9 \pm 0,7	7
Kollagen IV + Fibronectin + Laminin (1:1:1)	11,3 \pm 2,0	16,6 \pm 5,8	7

4 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 20: TEER-Werte von hCMEC/D3 unter variierenden Kultivierungsbedingungen: Porengröße (0,4, 0,1, 3,0 μm ; $n = 5 - 6$), Medienzusätze (Serum, Hydrocortison, cAMP + Ro und Calcium; $n = 4 - 8$), Beschichtungsmaterial (ohne Beschichtung, Kollagen I, Kollagen G, Kollagen IV, Fibronectin, Laminin und Kombinationen; $n = 3$) sowie Zellarrangement (hCMEC/D3 und SVGmm als Mono-Kultur sowie direkte und indirekte Ko-Kultur; $n = 4 - 8$); (M) TEER-Mittelwert nach dem Erreichen eines konfluenten Monolayers, (M TEER_{max}) Mittelwert der höchsten TEER-Werte und der dazugehörige Zeitpunkt; $M \pm SD$; * $p < 0,05$ im Vergleich zur ersten Zeile des jeweiligen Abschnitts bzw. bei den Zellarrangements zu den jeweiligen hCMEC/D3-Mono-Kulturen

Kultivierungsbedingungen	TEER $M [\Omega \cdot \text{cm}^2]$	TEER _{max} $M [\Omega \cdot \text{cm}^2]$	Zeit [d]
Zellarrangement (EGM-2/AM ab Tag 3; Kollagen I)			
hCMEC/D3 auf 0,4 μm ThinCert™	$17,2 \pm 2,4$	$18,9 \pm 2,4$	7
SVGmm auf 0,4 μm ThinCert™	$32,2 \pm 9,0^*$	$40,5 \pm 5,5^*$	7
hCMEC/D3 + SVGmm auf 0,4 μm ThinCert™ (direkt)	$38,8 \pm 6,5^*$	$44,9 \pm 4,6^*$	7
hCMEC/D3 + SVGmm auf 0,4 μm ThinCert™ (indirekt)	$17,8 \pm 0,7$	$18,4 \pm 1,6$	7
hCMEC/D3 auf 0,4 μm Transwell™	$9,8 \pm 0,8$	$10,6 \pm 1,2$	7
SVGmm auf 0,4 μm Transwell™	$19,8 \pm 5,1^*$	$24,0 \pm 3,3^*$	7
hCMEC/D3 + SVGmm auf 0,4 μm Transwell™ (direkt)	$22,9 \pm 3,7^*$	$25,8 \pm 4,9^*$	7
hCMEC/D3 + SVGmm auf 0,4 μm Transwell™ (indirekt)	$7,0 \pm 1,0$	$8,4 \pm 1,1$	7

Für die Versuche wurden transparente PET-Membranen verwendet, die eine Kontrolle der Zellkonfluenz unter dem Mikroskop ermöglichten. Bei der Untersuchung der optimalen Porengröße erreichten die Endothelzellen auf Membranen mit 0,4 μm Poren einen TEER-Wert von $15,1 \pm 1,9 \Omega \cdot \text{cm}^2$, der höher liegt als bei Membranen mit 1,0 ($8,6 \pm 0,3 \Omega \cdot \text{cm}^2$) bzw. 3,0 μm ($13,4 \pm 1,9 \Omega \cdot \text{cm}^2$) Porengröße. Auf dieser Grundlage wurden für die nachfolgenden Untersuchungen Membranen mit einer Porengröße von 0,4 μm ausgewählt. Der gemittelte TEER-Wert des statischen Mono-Kulturmodells variierte unter allen getesteten Kultivierungsbedingungen von $7,2 \Omega \cdot \text{cm}^2$ bis $17,2 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Die höchsten maximalen TEER-Werte wurden mit unbeschichteten ThinCerts™ in EGM-2 ($20,3 \pm 3,0 \Omega \cdot \text{cm}^2$) erreicht. Die Zelladhäsion blieb im Vergleich zur Standardkultivierung mit Kollagenbeschichtung unverändert (Daten nicht dargestellt). Das deutet darauf hin, dass keiner der getesteten Parameter die Barriereintegrität des Mono-Kulturmodells mit hCMEC/D3 Zellen signifikant beeinflusste.

Bei einer direkten Ko-Kultur mit der humanen Astrozytenzelllinie SVGmm stiegen die mittleren TEER-Werte signifikant an. Je nach verwendetem Zellkultureinsatz wurden TEER-Werte von $38,8 \pm 6,5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (ThinCert™) und $22,9 \pm 3,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Transwell™)

erreicht. Bei der indirekten Ko-Kultur hingegen blieb der TEER unverändert. Interessanterweise erzielten die Astrozyten als Mono-Kultur bereits einen ähnlichen TEER-Wert ohne einen signifikanten Unterschied zur Ko-Kultur (Tabelle 20). Das bedeutet, dass die Ko-Kultivierung zwar zu einer TEER-Erhöhung führte, diese allerdings ausschließlich durch die Anwesenheit der Astrozyten und nicht durch eine Verbesserung der endothelialen Barriereintegrität zu erklären ist. Um eine Variation der interzellularen Kommunikation zwischen dem luminalen und basolateralen Kompartiment zu erreichen, wurden Zellkultureinsätze der Firmen Greiner® Bio-One (ThinCert™ mit $2 \cdot 10^6$ Poren/cm²) und Corning® (Transwell™ mit $4 \cdot 10^6$ Poren/cm²) miteinander verglichen. Hierbei zeigten die Zellen auf Membranen mit geringeren Porendichten höhere TEER-Werte. Die Wahl des Zellkultureinsatzes ist also entscheidend für die Höhe des TEER-Wertes, obgleich der Leerwert des unbesiedelten Zellkultureinsatzes jeweils herausgerechnet wurde.

4.2.2.1 Permeationsuntersuchungen in einem Mono- und Ko-Kulturmodell der Blut-Hirn-Schranke

Das Ko-Kulturmodell mit der Astrozytenzelllinie SVGmm entwickelte die höchsten TEER-Werte und wurde deshalb für Permeationsstudien mit den Markermolekülen Natriumfluoreszein und FITC-Dextran 4 kDa verwendet. Bei der Permeation mit Natriumfluoreszein wurden zusätzlich die Zellkultureinsätze ThinCert™ und Transwell™ miteinander verglichen.

Der Permeationskoeffizient (P_{app}) von Natriumfluoreszein verringerte sich bei einer Ko-Kultivierung mit Astrozyten gegenüber der Mono-Kultur der hCMEC/D3 Zelllinie signifikant, dargestellt in Abbildung 24. Wie bei den TEER-Untersuchungen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der direkten Ko-Kultur und der Astrozyten-Mono-Kultur festgestellt werden. Dies deutet erneut darauf hin, dass die Astrozyten-Zelllinie keinen Einfluss auf die Barriereintegrität der hCMEC/D3-Zelllinie hat. Bei der indirekten Ko-Kultivierung zeigten sich eine leichte Steigerung des Permeationskoeffizienten sowie ein Farbumschlag des Mediums von Rot zu Orange, verursacht durch eine pH-Verschiebung in den sauren Bereich. Bezogen auf das gesamte *Well* kam bei der indirekten Ko-Kultivierung eine höhere Astrozyten-Zellzahl als bei der direkten Ko-Kultivierung zum Einsatz. Aus diesem Grund wurden

wahrscheinlich die Nährstoffe im Medium schneller verbraucht und vermehrt Glukose zu Laktat abgebaut. Zougbedé et al. untersuchten den Einfluss des pH-Wertes auf die Barriereintegrität von hCMEC/D3 Zellen und ermittelten bei einem $\text{pH} \leq 6$ deutlich erhöhte Permeationskoeffizienten (Zougbedé et al. 2011). Möglicherweise steht auch der erhöhte Nährstoffverbrauch in einem Zusammenhang mit den höheren Permeationskoeffizienten, da Nährstoffe wie z. B. L-Glutamin wichtig sind für die Ausbildung der Barriereintegrität (DeMarco et al. 2003).

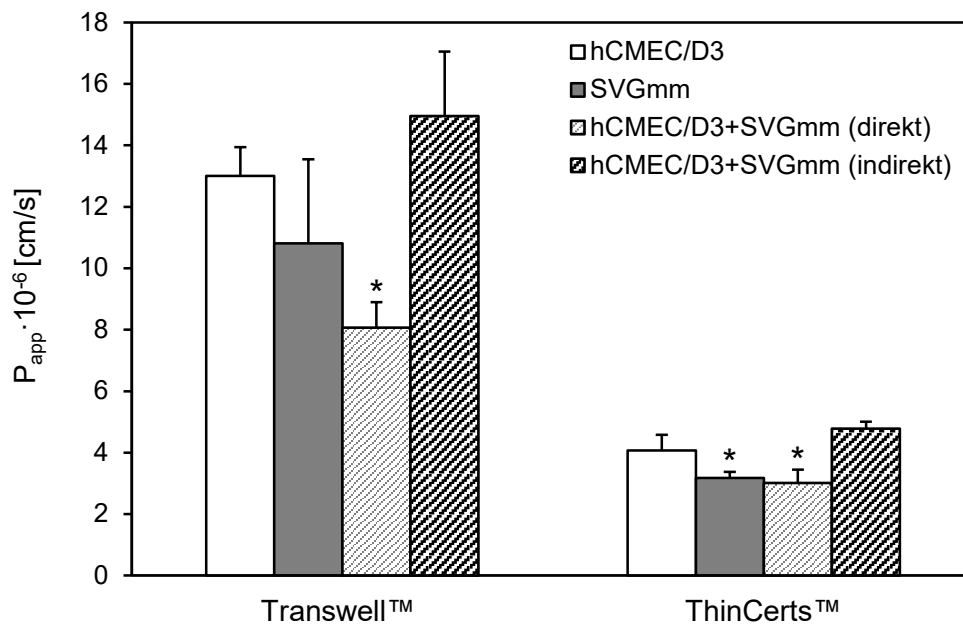


Abbildung 24: Permeationskoeffizienten berechnet als P_{app} für die Permeation von Natriumfluoreszein durch ein Mono-Kulturmodell (hCMEC/D3) und durch ein direktes bzw. indirektes Ko-Kulturmodell (hCMEC/D3 + SVGmm); Vergleich zwischen 12-Well-Zellkultureinsätzen von Corning® (Transwells™; transparente PET-Membran, 0,4 μm Porengröße, $4 \cdot 10^6$ Poren/ cm^2) und von Greiner® (ThinCerts™; transparente PET-Membran, 0,4 μm Porengröße, $2 \cdot 10^6$ Poren/ cm^2) ($n = 4 - 8$); $M \pm SD$; * $p < 0,05$ im Vergleich zur jeweiligen hCMEC/D3 Mono-Kultur

Zusätzlich zum scheinbaren Permeationskoeffizienten wurde der endotheliale Permeationskoeffizient (P_e) ermittelt, bei dem ein Einfluss der Membran herausgerechnet wird (Abschnitt 3.2.8.7). Hierbei zeigten sich die endothelialen Permeationskoeffizienten von Natriumfluoreszein durch die jeweiligen Zellarrangements vergleichbar auf den Transwell™- und ThinCert™-Membranen. Unabhängig von der Wahl des Zellkultureinsatzes wurde der geringste Permeationskoeffizient bei einer Permeation durch das direkte Ko-Kulturmodell und der höchste Permeationskoeffizient bei einer Permeation durch das indirekte Ko-Kulturmodell ermittelt (Tabelle 21).

Tabelle 21: Permeationskoeffizienten berechnet als P_e für die Permeation von Natriumfluoreszein durch ein Mono-Kulturmodell (hCMEC/D3) und ein direktes bzw. indirektes Ko-Kulturmodell (hCMEC/D3 + SVGmm); es wurden 12-Well-Zellkultureinsätze von Corning® (Transwells™; transparente PET-Membran, 0,4 µm Porengröße, $4 \cdot 10^6$ Poren/cm²) und von Greiner® (ThinCerts™; transparente PET-Membran, 0,4 µm Porengröße, $2 \cdot 10^6$ Poren/cm²) verwendet. (n = 4 – 8); $M \pm SD$

BHS-Modell	Permeationskoeffizient P_e [$\cdot 10^{-3}$ cm/min]	
	Transwell™	ThinCert™
hCMEC/D3	1,01 \pm 0,10	0,96 \pm 0,60
SVGmm	0,87 \pm 0,33	0,49 \pm 0,30
hCMEC/D3 + SVGmm (direkt)	0,55 \pm 0,07	0,40 \pm 0,27
hCMEC/D3 + SVGmm (indirekt)	1,87 \pm 0,19	2,24 \pm 0,61

Weitere Permeationsuntersuchungen wurden bei der direkten Ko-Kultivierungsvariante auf Transwell™-Membranen mit dem Markermolekül FITC-Dextran 4 kDa durchgeführt und mit den Mono-Kultivierungsvarianten sowie den Zellkultureinsätzen ohne Zellen verglichen. Ähnlich wie bei den Permeationsuntersuchungen mit Natriumfluoreszein erreichten die Endothelzellen als Mono-Kultur einen deutlich größeren Permeationskoeffizienten im Vergleich zur Ko-Kultur. Allerdings zeigte sich auch hierbei kein Unterschied hinsichtlich des Permeationskoeffizienten zwischen dem Astrozyten-Monolayer und dem Ko-Kulturmodell (Tabelle 22). Der Permeationskoeffizient von FITC-Dextran 4 kDa ist vergleichbar mit den Literaturangaben (Helms et al. 2016; Ragnai et al. 2011).

Tabelle 22: Fluxdaten und Permeationskoeffizienten für die Permeation von FITC-Dextran 4 kDa durch ein Mono-Kulturmodell (hCMEC/D3) und ein direktes Ko-Kulturmodell (hCMEC/D3 + SVGmm); es wurden 12-Well-Zellkultureinsätze von Corning® verwendet. (n = 2 – 6); $M \pm SD$

Permeationsmodell mit 250 µg/ml FD4	Flux J [$\cdot 10^{-4}$ µg/cm ² · s]	Permeationskoeffizient P_{app} [$\cdot 10^{-6}$ cm/s]
hCMEC/D3	13,50 \pm 0,88	5,40 \pm 0,35
SVGmm	8,03 \pm 0,54	3,21 \pm 0,22
hCMEC/D3 + SVGmm (direkt)	8,23 \pm 0,72	3,29 \pm 0,29
Zellkultureinsatz ohne Zellen	35,93 \pm 0,19	14,40 \pm 0,75

4.2.3 Zusammenfassende Diskussion zur Untersuchung diverser Kultivierungsvariationen der humanen Endothelzelllinie

In allen untersuchten Zellkulturmedien wiesen die Endothelzellen eine vergleichbare Zellmorphologie wie in ihrem Standardmedium EGM-2 auf. Die Untersuchungen hinsichtlich der Anheftungseffizienz deuten darauf hin, dass die Zelladhäsion an das Substrat von allen Zellkulturmedien unterstützt wird. Unterschiede zwischen den serumhaltigen und serumfreien Zellkulturmedien, wie sie z. B. bei den Hamster-Lungenzellen beobachtet wurden (Ali Yildirim 1996), konnten beim Anheftungsverhalten nicht festgestellt werden. Analog zu den hCMEC/D3 Zellen adhärieren HUVEC Zellen ebenfalls in Abwesenheit von Serum an die Wachstumsoberfläche, sofern diese mit Fibronektin, Kollagen oder Ähnlichem beschichtet waren (Macarak und Howard 1983). Zur Ermittlung der Langzeitadhäsion könnte man die Anheftungseffizienz nach weiteren verlängerten Zeitspannen bestimmen.

Die PDT der Endothelzellen betrug innerhalb der unterschiedlichen Zellkulturmedien 1,0 bis 1,6 Tage, was vergleichbar mit der Literaturangabe von ungefähr 1,0 Tagen ist (dos Santos et al. 2011). Neben der PDT sind die lag-Phase und die Sättigungsdichte wichtige Parameter für das Wachstumsverhalten. In den Medien DMEM, RPMI 1640, und M199 zeigte sich eine stark reduzierte und in Ham's F-12 und DMEM/Ham's F-12 eine leicht reduzierte Sättigungsdichte. Diese Zellkulturmedien bieten daher keine adäquate Versorgung und sind für die Kultivierung der Endothelzelllinie eher ungeeignet. Bei einer Kultivierung in den Medien ECGM MV-2 und MDCB 131, dem Vorläufer von EGM-2, ist das Wachstumsverhalten vergleichbar zu dem im Standardmedium. Beide Medien werden für die Kultivierung von mikrovaskulären Endothelzellen empfohlen und die Ergebnisse entsprechen somit den Erwartungen. Die geringere lag-Phase und höhere Sättigungsdichte der Endothelzellen in MCDB 131 im Vergleich zu denen in DMEM, Ham's F-12, DMEM/Hams F12, M199 und RPMI 1640 könnten auf eine 10-fach höhere Magnesiumkonzentration in MCDB 131 zurückführbar sein. Frühere Studien zeigten, dass hohe Magnesiumkonzentrationen ein Stimulus für die Proliferation von HMVEC bzw. HUVEC sind (Maier 2004; Knedler und Ham 1987). Ein direkter Vergleich aller Basalmedien ist schwerlich möglich, da diese aus zahlreichen Bestandteilen bestehen und die jeweiligen Zusammensetzungen teilweise den Herstellern vorbehalten sind.

Des Weiteren ließ sich die hCMEC/D3 Zelllinie unter serumfreien Bedingungen kultivieren. Nach einer längeren Latenzphase zeigten die Zellen ein ähnliches Wachstumsverhalten in hESFM wie im Standardmedium. Das Medium stellt somit eine gute serumfreie Alternative dar. Es wurde allerdings weder bei der serumhaltigen noch bei der serumfreien Kultivierung ein positiver Einfluss auf die Barriereintegrität festgestellt. Darüber hinaus war der Einfluss der untersuchten Zellkulturmedien auf die Genexpression der Zell-Zell-Kontaktproteine gering und nur in hESFM wurde ein leichter Anstieg des Proteins Occludin beobachtet.

Die Endothelzellen entwickelten auf Membranen sowohl mit 0,4 μm als auch mit 3,0 μm Poren signifikant höhere TEER-Werte als auf Membranen mit 1,0 μm Poren. Der gesteigerte TEER-Wert bei 3,0 μm großen Poren erscheint zunächst widersprüchlich, korreliert jedoch mit den Beobachtungen von Wuest et al. Als Grund für die unerwartet hohen TEER-Werte der größten Porengröße wird eine Zellmigration durch diese Poren und die einhergehende Bildung eines zweiten Monolayers auf der Rückseite der Membran angeführt (Wuest et al. 2013). Darüber hinaus zeigten ThinCert™-Membranen im Vergleich zu Transwell™-Membranen mit einer höheren Porendichte einen Anstieg der TEER-Werte. Das belegt wie wichtig die Auswahl der geeigneten Membran für die TEER-Entwicklung eines Blut-Hirn-Schranke-Modells ist (Ye et al. 2015; Wuest et al. 2013; Eigenmann et al. 2013). Gleichzeitig erschwert es einen direkten Vergleich der TEER-Werte in der Literatur. Die Verwendung von Membranen mit unterschiedlichen Porendichten führte jedoch nicht zu einer wesentlichen Veränderung des endothelialen Permeabilitätskoeffizienten von Natriumfluoreszein.

Die Abwesenheit von Serum oder die Zugabe unterschiedlicher Serumkonzentrationen ins Zellkulturmedium veränderten den TEER-Wert ebenfalls nicht. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Eigenmann et al. (Eigenmann et al. 2013). Auch Poller et al. ermittelten an ihrem Blut-Hirn-Schranke-Modell mit der hCMEC/D3 Zelllinie keinen Unterschied hinsichtlich der Permeation von Saccharose bei Serumkonzentrationen von 2,5 %, 5 % oder 10 %. In dieser Studie wurde jedoch eine signifikant reduzierte Permeabilität bei allen drei Konzentrationen erreicht durch die Verwendung von humanem Serum anstelle von Kälberserum (Poller et al. 2008). Eigenmann et al. hingegen konnten diese Ergebnisse mit der

humanen BMEC Zelllinie nicht bestätigen, was sie auf eine höhere Chargenvariabilität des verwendeten humanen Serums zurückführten (Eigenmann et al. 2013). Weitere Mediensupplemente, wie Hydrocortison, cAMP + RO-20-1724 und Calcium, sowie unterschiedliche Beschichtungsvarianten mit den Hauptkomponenten der zerebralen Basalmembran, wie Kollagen IV, Fibronectin und Laminin, (Tilling et al. 2002) zeigten in der vorliegenden Arbeit ebenfalls keinen Einfluss auf die Barriereeigenschaften. Im Gegensatz dazu stellten Tilling et al. bei der Beschichtung mit Kollagen IV, Fibronectin und Laminin einen Anstieg des TEER-Wertes von PBEC fest (Tilling et al. 1998). Diese voneinander abweichenden Ergebnisse können durch unterschiedliche Materialien, Kultivierungsbedingungen und vor allem durch die Verwendung von primären Zellen zustande kommen.

Eine signifikante Erhöhung der TEER-Werte konnte bei den durchgeführten Untersuchungen durch eine direkte Ko-Kultivierung mit der humanen Astrozytenzelllinie SVGmm erreicht werden. Allerdings entwickelte bereits die Astrozyten-Mono-Kultur vergleichbare TEER-Werte und Permeationskoeffizienten wie die direkte Ko-Kultur. Das deutet darauf hin, dass Astrozyten keinen Einfluss auf die endotheliale Barriereintegrität der hCMEC/D3 Zellen haben. Vielmehr betont es die geringe Barriereichtigkeit der Endothelzellen, da bereits die Astrozytenzelllinie ohne barrierebildende Merkmale höhere TEER-Werte erreichte. Möglicherweise wiesen die benachbarten Astrozytenfortsätze ein überlagertes Zellwachstum auf, woraus sich ein leicht höherer Widerstand im Vergleich zu dem des konfluenten hCMEC/D3-Monolayers ergab.

4.3 Weiterentwicklung des dynamischen Zellkulturmodells zum *Cerebral DynaMiTES*

Das dynamische Zellkultursystem DynaMiTES (Abschnitt 3.1.7) wurde für *in vitro*-Absorptionsstudien am Auge entwickelt und unter Anwendung des Hemicornea-Konstrukts etabliert (Beißner et al. 2018; Mattern et al. 2018). Die Zellen wurden auf herkömmlichen Transwell™-Zellkultureinsätzen kultiviert und durch ein einfaches Steckprinzip ins DynaMiTES überführt. Durch dieses Prinzip sollten sich etablierte statische Transwell™-Zellkulturmodelle, wie z. B. das humane Blut-Hirn-Schranke-Modell, mit wenigen Modifikationen auf das dynamische Zellkultursystem übertragen lassen. Der folgende Abschnitt behandelt die Ergebnisse der Material- und Elektrodenuntersuchungen sowie die notwendigen Modifikationen des Blut-Hirn-Schranke-Modells.

Für die Verwendung eines geeigneten *in vitro*-Zellkulturmodells ist die Zellkompatibilität der einzelnen Materialien eine Grundvoraussetzung. In einer vorhergehenden Studie von Mattern et al. wurde gezeigt, dass das Grundkörpermaterial Polycarbonat, das Hülsenmaterial Aluminium und das Elektrodenmaterial Edelstahl über einen Zeitraum von 3 h zellverträglich sind. Auch eine Kultivierung des inversen Hemicornea-Konstrukts im zusammengebauten DynaMiTES hatte keinen negativen Einfluss auf die Zellviabilität (Mattern et al. 2018). Im Hinblick auf die Etablierung einer Langzeitkultivierung im DynaMiTES wurden in der vorliegenden Arbeit weitere Materialien über den längeren Zeitraum von 3 d untersucht. Die Endothelzellen wurden entweder ab der Einsaat oder ab dem Zeitpunkt der Zellkonfluenz mit der Materialprobe inkubiert. Die Zellviabilität wurde mittels Quantifizierung mitochondrialer Redoxäquivalente (MTT-Assay) ermittelt (Tabelle 23).

Die untersuchten Materialien waren überwiegend zellkompatibel und resultierten in Zellviabilitäten über 85 % (Tabelle 23). Eine Ausnahme bildeten zwei Dichtungsmaterialien: Acrylnitril-Butadien-Kautschuk (*nitrile butadiene rubber*; NBR), ein Copolymer aus Butadien und Acrylnitril, führte unabhängig vom Inkubationsbeginn zu einem vollständigen Verlust der Zellviabilität. Chloropren-Kautschuk (*chloroprene rubber*, CR) reduzierte die Zellviabilität um ca. 42 % bei einer Inkubation ab der Einsaat, während es bei einer Inkubation ab der Konfluenz zu keiner Einschränkung

der Zellviabilität kam. Im Unterschied dazu wies die Materialprobe aus geschäumtem Chloropren-Kautschuk, hier bezeichnet als Neopren, bereits ab der Einsaat eine gute Zellverträglichkeit auf. Die Materialien Silikon und EPDM, ein Terpolymer aus Ethylen, Propylen und einem nicht näher spezifizierten Dien, waren zellverträglich und finden häufig Anwendung in mikrofluidischen Zellkultursystemen (Bunge et al. 2017; Rach et al. 2013; Gray et al. 2002). Für die weiterführenden Untersuchungen wurde EPDM als einheitliches Material für alle Dichtungsringe ausgewählt. Darüber hinaus wurden für weitere Untersuchungen (Abschnitt 4.6.2) zeitweise die zellkompatiblen Dichtungsringe Silikon und Teflon eingesetzt. Der Tygon® ST-Schlauch aus PVC wurde, trotz guter Zellverträglichkeit, im weiteren Verlauf durch einen Silikonschlauch ersetzt, da dieser laut Herstellerangaben eine längere Lebensdauer aufweist und für sterile Anwendungen besser geeignet ist.

Tabelle 23: Zellviabilitätsuntersuchungen mittels MTT-Assay nach der indirekten Inkubation verschiedener DynaMITEs-Materialien mit den hCMEC/D3 Zellen über einen Zeitraum von 3 d: NBR (n = 3 – 5), CR (n = 6), EPDM (n = 6), Silikon (n = 3), Neopren (n = 3), Silikonfolie (n = 3), Acrylatfolie (n = 4), Tygon® (n = 2), PTFE (n = 6); sofern nicht anders angegeben wurden die Zellen mit der Materialprobe ab der Einsaat inkubiert. Die Prozentangaben beziehen sich auf die jeweiligen Kontrollzellen. Fett gedruckte Zahlen markieren eine Zellviabilität unter 80 %. *M ± SD*

Material	Zellviabilität Kontrolle [%]	Zellviabilität Materialprobe [%]
Dichtungsringe		
NBR	100,0 ± 20,2	0,3 ± 0,2
NBR ab Tag 3	100,0 ± 10,8	0,3 ± 0,3
CR	100,0 ± 20,2	57,6 ± 35,4
CR ab Tag 3	100,0 ± 12,2	117,5 ± 17,8
EPDM	100,0 ± 15,9	95,8 ± 16,2
Silikon	100,0 ± 20,2	110,2 ± 7,1
Neopren	100,0 ± 18,2	85,5 ± 17,1
Dichtungsfolie		
Silikon (autoklaviert)	100,0 ± 6,2	94,9 ± 6,7
Silikon (mit Ethanol gereinigt)	100,0 ± 6,2	99,3 ± 5,2
Acrylat	100,0 ± 2,7	98,8 ± 2,4
Schläuche		
Tygon® ST	100,0 ± 20,2	95,4 ± 21,0
Teflon (PTFE)	100,0 ± 5,3	98,3 ± 7,9

4.3.1 Elektrodenvergleich mit herkömmlichen Elektroden

Aufgrund ausgeprägter Barriereigenschaften mit TEER-Werten über $3500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ wurde für den Elektrodenvergleich die Epithelzelllinie MDCK (Abschnitt 3.2.1.5) verwendet. Nach einem Mediumwechsel wurden die TEER-Werte von jedem Zellkultureinsatz nacheinander mit der Endohm®-Kammer, der STX2®-Elektrode und der DynaMiTES-Elektrode bestimmt. Die Messwerte lagen bei allen drei Elektroden in einem ähnlichen Bereich, wobei die TEER-Werte der Endohm-Kammer signifikant niedriger waren als die TEER-Werte der anderen beiden Elektrodentypen (Abbildung 25). Die Blankwerte der Endohm®-Kammer und der STX2®-Elektrode lagen vergleichbar mit den Herstellerangaben bei $3,0 \pm 1,4 \Omega$ bzw. $134,8 \pm 3,2 \Omega$ und der Blankwert des DynaMiTES befand sich bei $42,1 \pm 8,1 \Omega$. Die höheren Blankwerte und Standardabweichungen der STX2®-Elektrode oder der DynaMiTES-Elektroden erschweren eine valide Messung von Zellen mit geringen Barriereigenschaften, wie z. B. der hCMEC/D3 Zelllinie.

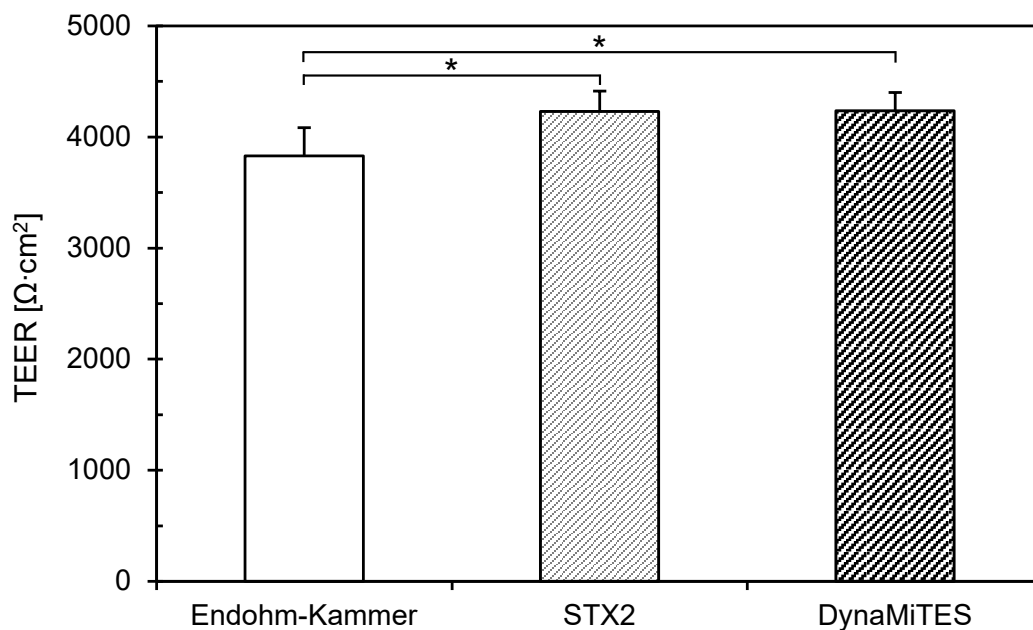


Abbildung 25: TEER-Werte von MDCK Monolayern gemessen mit den Elektroden der Endohm®-Kammer, der STX2®-Elektrode und des DynaMiTES ($n = 6$); $M \pm SD$; * $p < 0,05$

4.3.2 Anpassung an das DynaMiTES

4.3.2.1 Einfluss der Zellorientierung auf die Endothelzellen

Die Zellen wurden für eine Anwendung im DynaMiTES invers auf die Unterseite der PET-Membran gesät (Abschnitt 3.2.8.1). Versuchsweise wurde vor der Aussaat um den Zellkultureinsatz ein Silikonschlauch (1 cm hoch, 14,0 bzw. 15,0 mm Durchmesser) gezogen und damit ein flüssigkeitsdichter apikaler Raum erzeugt. Nach der Inkubation hatte sich durch das Entfernen des Silikonschlauchs in vielen Fällen die Membran abgelöst. Bur et al. verwendeten für das inverse Lungenmodell ebenfalls spezielle Schläuche, allerdings blieben Details wie das Material unerwähnt. Auch eine mögliche Schädigung der Zellen wurde nicht beschrieben (Bur et al. 2009). Da für die vorliegenden Untersuchungen die Methode mit dem Schlauch keinen Vorteil brachte, wurde die herkömmliche Methode beibehalten und ein Herunterlaufen der Zellsuspension durch erschütterungsfreies Arbeiten verhindert.

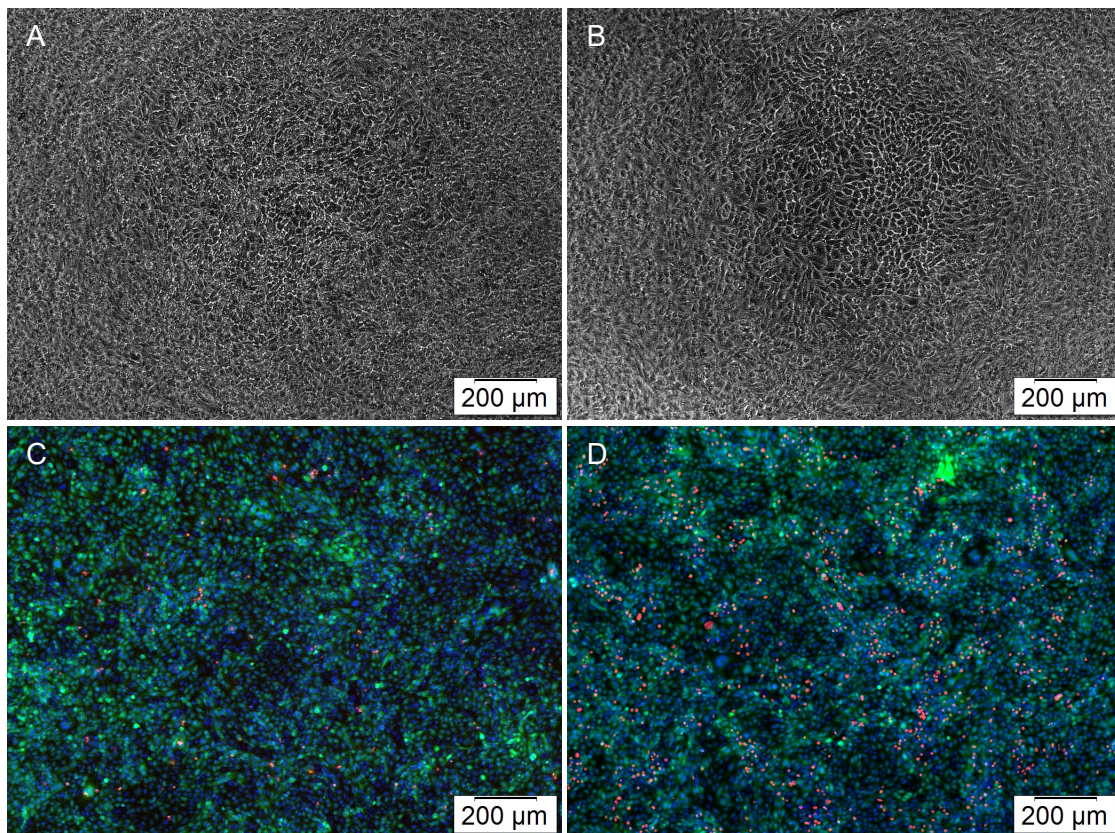


Abbildung 26: Lichtmikroskopische Aufnahmen mit Phasenkontrast von hCMEC/D3 auf ThinCert™-Membranen normal (A) und invers kultiviert (B); Lebend/Tot-Färbung mit Calcein (grün), PI (rot) und Hoechst 33342 (blau) von normal (C) und invers (D) kultivierten Zellen

Unabhängig von ihrer Zellorientierung auf der Membran bildeten die Endothelzellen eine spindelförmige Morphologie aus, die sich mit zunehmender Konfluenz hin zu einer polygonalen Form entwickelte (Abbildung 26, A + B). Mit Hilfe der Lebend/Tot-Färbung wurde ein konfluenter Zellmonolayer aus überwiegend vitalen Zellen nachgewiesen (Abbildung 26, C + D). In den Randbereichen des Zellkultureinsatzes wurden bei der inversen Kultivierung vermehrt tote Zellen detektiert. Es ist anzunehmen, dass der Randbereich keinen Einfluss auf die Barriereeigenschaften hat, da dieser bei der normalen Kultivierung ohnehin nicht zur Verfügung steht. So bestätigten weiterführende Untersuchungen, dass es keinen Unterschied zwischen der Barriereintegrität des normalen und des inversen Blut-Hirn-Schranke-Modells gab (Tabelle 24). Allerdings zeigte das Modell mit der inversen Zellorientierung eine reduzierte Zellviabilität, die auf eine deutlich geringere Zellzahl zurückzuführen ist.

Tabelle 24: Zell- und Barriereeigenschaften von hCMEC/D3 Zellen bei normaler und inverser Zellorientierung auf Transwell™-Membranen nach 3 d: Zellviabilität mittels MTT (n = 12 in CO₂-IDM, n = 3 in EGM-2), Zellmembranintegrität mittels Trypanblaufärbung (n = 3), Zellzahl (n = 3), TEER und P_{app} von NaF (n = 8); M ± SD

Zellorientierung	normal	invers
Zelleigenschaften		
Zellviabilität [%] in CO ₂ -IDM	100,0 ± 9,4	71,5 ± 10,2
Zellviabilität [%] in EGM-2	100,0 ± 3,9	69,1 ± 10,4
Zellmembranintegrität [%] in EGM-2	93,4 ± 0,5	94,2 ± 2,2
Zellzahl [Zellen/ml] in EGM-2	546 667 ± 32 316	343 667 ± 67 575
Barriereeigenschaften		
TEER [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]	10,6 ± 1,2	11,3 ± 1,3
P _{app} [cm/s] von 25 µg/ml NaF	$1,3 \cdot 10^{-5} \pm 9,4 \cdot 10^{-7}$	$1,1 \cdot 10^{-5} \pm 2,4 \cdot 10^{-6}$

4.3.2.2 Verwendung eines CO₂-unabhängigen Mediums

Das dynamische Zellkultursystem besteht aus einem gasimpermeablen Polycarbonat-Grundkörper, der einen CO₂-Austausch einschränkt. In einem Vorversuch wurden verschiedene CO₂-unabhängige Kultivierungsvarianten anhand der Zelllinie MDCK getestet. Das CO₂-unabhängige Medium CO₂-IDM von Gibco® stellte sich als am geeignetsten heraus (Daten nicht gezeigt) und wurde für die folgenden Untersuchungen verwendet. Es enthält ein Puffersystem aus mono- und dibasischem

Natriumphosphat und β -Glycerophosphat sowie eine geringe Menge Bicarbonat. Alternativen wie der Zusatz von 25 mM HEPES ins herkömmliche Medium oder eine Vorinkubation des Mediums im Brutschrank mit 5 % CO₂ haben das Wachstum der MDCK Zellen unzureichend unterstützt. Im Folgenden wird auf den Einfluss einer Kultivierung der Endothelzellen im CO₂-unabhängigen Medium näher eingegangen.

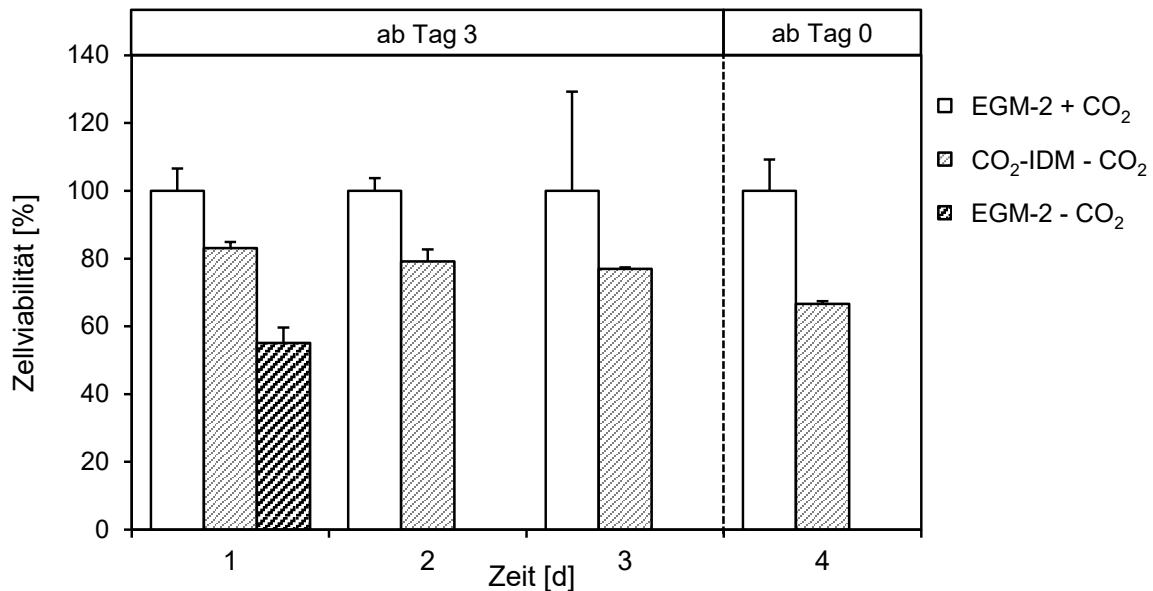


Abbildung 27: Die Zellviabilität von hCMEC/D3 mittels MTT-Assay bei einer Kultivierung in EGM-2 mit CO₂, CO₂-IDM ohne CO₂, EGM-2 ohne CO₂ ab Tag 3 und ab Tag 0 (n = 4); $M \pm SD$

Die Zellen wurden entweder ab ihrer Konfluenz für ein bis drei Tage oder ab der Einsaat für vier Tage in einer 12-Well-Platte in CO₂-IDM kultiviert. Als Vergleichsmedium diente EGM-2 in einer Umgebung mit 5 % CO₂ bzw. ohne CO₂-Austausch. Die Untersuchungen zeigten, dass die Endothelzellen unter Verwendung von CO₂-IDM einen konfluenten Zellmonolayer ausbildeten. Wurden die Endothelzellen ab der Einsaat in CO₂-IDM kultiviert, erreichten sie eine Zellviabilität von 67 %, wohingegen bei einer Kultivierung ab der Konfluenz die Zellviabilität 77 bis 83 % betrug. Die reduzierte Zellviabilität ist wahrscheinlich auf eine geringere Zellproliferation zurückzuführen. Im Unterschied zum EGM-2 ist das alternative Medium CO₂-IDM nicht auf eine Kultivierung von mikrovaskulären Endothelzellen abgestimmt. Für weiterführende Aussagen müssten Proliferationsstudien mit Zellen in CO₂-IDM durchgeführt werden. Bei einer Zellkultivierung im Standardmedium ohne CO₂-Austausch nahm die Zellviabilität vermutlich durch einen pH-Anstieg schon nach einem Tag deutlich ab (Abbildung 27).

4.3.3 Zusammenfassende Diskussion zur Weiterentwicklung des dynamischen Zellkulturmodells zum *Cerebral DynaMiTES*

Ein wesentlicher Aspekt waren die Untersuchungen verschiedener DynaMiTES-Materialien hinsichtlich ihrer Zellkompatibilität. Das Dichtungsmaterial CR führte zu einer leichten und NBR zu einer vollständigen Reduzierung der Zellviabilität. Neben der Herstellung von Schläuchen und Gummidichtungen wird NBR auch zur Herstellung von Handschuhen verwendet. Lönnroth et al. haben Laborhandschuhe in einer Biokompatibilitätsstudie untersucht und ebenfalls gezeigt, dass NBR einen zytotoxischen Effekt auf Fibroblasten ausüben kann. Die abweichenden Ergebnisse zwischen verschiedenen Herstellern wurden auf unterschiedlich verwendete Zusatzstoffe wie z. B. Stabilisatoren zurückgeführt (Lönnroth 2005). Die variierenden Zusammensetzungen und Zusatzstoffe könnten auch für den unterschiedlichen Effekt zwischen dem herkömmlichen CR und dem geschäumten CR (Neopren) verantwortlich sein. Die einzelnen Dichtungsmaterialien wurden von Mattern et al. nicht betrachtet, allerdings wurde das zusammengebaute Gesamtsystem untersucht und kein schädigender Effekt auf die Zellen ermittelt (Mattern et al. 2018). Das gegensätzliche Ergebnis ist möglicherweise durch den unterschiedlichen Versuchsaufbau bedingt. Bei Mattern et al. befand sich der Dichtungsring aus NBR in der oberen Ebene und stand somit nicht zwangsläufig in direktem Kontakt mit dem Kultivierungsmedium, wohingegen in der vorliegenden Untersuchung ein direkter Kontakt zwischen dem Material und dem Medium vorlag. Weitere Ursachen könnten die unterschiedlichen *in vitro*-Modelle und Inkubationszeiten sein. Das Material EPDM wird aufgrund seiner Eigenschaften, wie z. B. eine hohe Biegefähigkeit und Abriebfestigkeit sowie eine gute Beständigkeit gegenüber wässrigen und öligen Medien, Ozon, Sonnenlicht und Wasserdampf, häufig in der Lebensmittel- und pharmazeutischen Industrie eingesetzt (Chanda und Roy 2008; Katbab et al. 1992). Im Unterschied zu den Dichtungsringen aus Silikon wurden die EPDM-Dichtungsringe vom Hersteller mit einer USP-Klassifizierung VI und FDA-geprüft bezogen, was bedeutet, dass sie für den Einsatz in Lebensmittel- und Arzneimittelherstellungsprozessen oder für biomedizinische Zwecke in den USA qualifiziert sind. Nachdem CR und NBR sich als ungeeignet herausgestellt hatten, wurde im Folgenden EPDM als einheitliches Dichtungsmaterial eingesetzt. EPDM zeigte in der vorliegenden Arbeit eine gute Zellverträglichkeit und bestätigt damit die Ergebnisse vorangegangener

Untersuchungen (Amin et al. 2018; Mast et al. 1997). Mast et al. beispielsweise belegten die Biokompatibilität bei einer direkten Kultivierung von humanen Fibroblasten auf EPDM-Platten und in einer Extraktionsstudie jeweils über 14 Tage (Mast et al. 1997). Im Unterschied dazu fanden Rach et al. bei einer Zytotoxizitätsuntersuchung heraus, dass FDA-geprüfte O-Ringe aus EPDM sowie einige Silikonarten einen schädigenden Effekt auf die Zellen haben. Sie stellten fest, dass das zytotoxische Potenzial nicht nur von der Art des Materials abhängig ist, sondern auch von der spezifischen Zusammensetzung seitens des Herstellers (Rach et al. 2013). Das belegt einmal mehr, wie wichtig individuelle Zellverträglichkeitsuntersuchungen für die jeweiligen spezifischen *in vitro*-Anwendungen sind.

In Anlehnung an die Elektroden der Endohm®-Kammer hat sich die Elektrodengeometrie im DynaMiTES von einer konzentrischen (Prototyp 1 und 2) hin zu einer stabförmigen Elektrode (ab Prototyp 3) entwickelt. Die Silber-Silberchlorid-Elektroden der Endohm®-Kammer erzeugen im Vergleich zu den STX2®-Elektroden, ebenfalls aus Silber-Silberchlorid, eine gleichmäßigere Stromdichte über einen größeren Bereich und ermitteln dadurch zuverlässigere Werte (Sheller et al. 2017; Douville et al. 2010). Ein wesentlicher Vorteil der STX2®-Elektroden ist, dass die Zellen während der Messung in ihrer ursprünglichen Zellumgebung verbleiben. Auch bei einer Zellkultivierung im DynaMiTES kann die Messung ohne eine Veränderung der Kultivierungsbedingungen und somit ohne einen zusätzlichen Stressfaktor für die Zellen durchgeführt werden. Die Elektroden im DynaMiTES ermöglichen TEER-Ergebnisse, die vergleichbar mit denen der STX2®-Elektrode sind. Ein signifikanter Unterschied wurde zwischen der Endohm®-Kammer und der DynaMiTES-Elektrode festgestellt. Sheller et al. verglichen die TEER-Werte der Endohm-Kammer® und der STX2®-Elektrode miteinander. Unter Verwendung der Zelllinien MCF-7 und MDCK fanden sie heraus, dass die STX2®-Elektrode geringere TEER-Werte als die Endohm-Kammer ermittelt (Sheller et al. 2017). Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Untersuchung nicht bestätigt werden, da die STX2®-Elektrode tendenziell höhere TEER-Werte als die Endohm®-Kammer gemessen hat. Wahrscheinlich spielt der Versuchsaufbau eine wesentliche Rolle. In der vorliegenden Untersuchung wurde jeder Zellkultureinsatz konsekutiv mit allen drei Elektrodentypen vermessen.

Um mögliche Einflüsse von der einen Messung auf die andere zu minimieren, wurde zwischen den Messungen Zeit für die Äquilibration gelassen. Angaben zum genauen Versuchsablauf und ob jeder Zellkultureinsatz jeweils nur mit einem oder mit beiden Messgeräten untersucht wurde, fehlen bei Sheller et al. So wird erneut deutlich, dass ein direkter Vergleich der TEER-Angaben in der Literatur durch die Verwendung verschiedener Messgeräte oder unterschiedlicher Versuchsabläufe nicht möglich ist.

Für einen Wechsel der Zellorientierung auf der Membran sind nur geringe Modifikationen erforderlich. Die vergleichbare Zellmorphologie, Zellviabilität und Barriereintegrität zwischen den normal und invers kultivierten Zellen belegen, dass die inverse Kultivierung von den Zellen gut vertragen wird. Auffällig ist jedoch, dass an die Unterseite der Membran weniger Endothelzellen adhärten. Das liegt wahrscheinlich an den unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften der Membran, die bereits makroskopisch erkennbar waren. Laut Herstellerangaben ist die normale Wachstumsfläche der PET-Membran physikalisch vorbehandelt worden, um die Adhärenz und Wachstumscharakteristika der Zellen zu verbessern. Bei der inversen Kultivierung wurde trotz erniedrigter Zellanheftung ebenfalls ein konfluenter Monolayer ausgebildet und das Verhältnis zwischen der Formazan-Absorption und der Zellzahl war proportional zueinander, was für eine unveränderte mitochondriale Aktivität der Zellen spricht. Aufgrund der geringeren Zellzahlen wurden bei den nachfolgenden Versuchen höhere Einsaatdichten von $1,3 \cdot 10^5$ Zellen/cm² eingesetzt. Ähnliche Einsaatdichten wurden in der Literatur auch im Zusammenhang mit der herkömmlichen Kultivierung verwendet (Weksler et al. 2005).

Beißner et al. haben für ihre dreistündigen Untersuchungen im DynaMiTES den pH-unabhängigen Puffer KRB ausgewählt. Jedoch kann bei längeren Kultivierungszeiten mit KRB die Versorgung der Zellen mit den benötigten Nährstoffen nicht sichergestellt werden. Auch das Standardmedium EGM-2 ist unter atmosphärischen Bedingungen keine Alternative, da ein zu hoher pH-Anstieg die Zellen bekanntermaßen schädigen kann (Eagle 1973). Bereits nach einem Tag war dieser Effekt in der vorliegenden Arbeit an einem ausgeprägten Zellviabilitätsverlust erkennbar. CO₂-IDM ist für die Kultivierung von adhärenz Säugetierzellen unter atmosphärischen Bedingungen geeignet. Die Endothelzellen ließen sich nach dem Erreichen der Konfluenz für drei Tage ohne deutliche Verluste der Zellviabilität kultivieren.

4.4 Kultivierung von hCMEC/D3 Zellen im *Cerebral* DynaMiTES

Eine Kultivierung unter Flussbedingungen kann sich auf das Zellwachstum, die Zellfunktion, die Morphologie, die Genexpression und den Phänotyp der Endothelzellen auswirken (Jiang et al. 2019). Der folgende Abschnitt behandelt den Einfluss einer statischen und dynamischen Kultivierung im DynaMiTES auf die Zell- und Barriereeigenschaften der hCMEC/D3 Zelllinie. Es wurden Flussraten von 0,03, 0,33 und 3,33 ml/min sowie Kultivierungszeiten von 3 h, 24 h, 72 h und 7 d untersucht.

4.4.1 Untersuchung verschiedener Ausgangskonfluenzen

Für die Untersuchung verschiedener Ausgangskonfluenzen wurden die Endothelzellen statisch, wie unter 3.2.8.1 beschrieben, für ein bis vier Tage kultiviert und dann ins DynaMiTES (Prototyp 2) überführt. Zur Bestimmung der Zellviabilitäten wurden mitochondriale Redoxäquivalente mittels MTT-Assay (Abschnitt 3.2.8.5.3) nach 24 h unter Flussbedingungen quantifiziert.

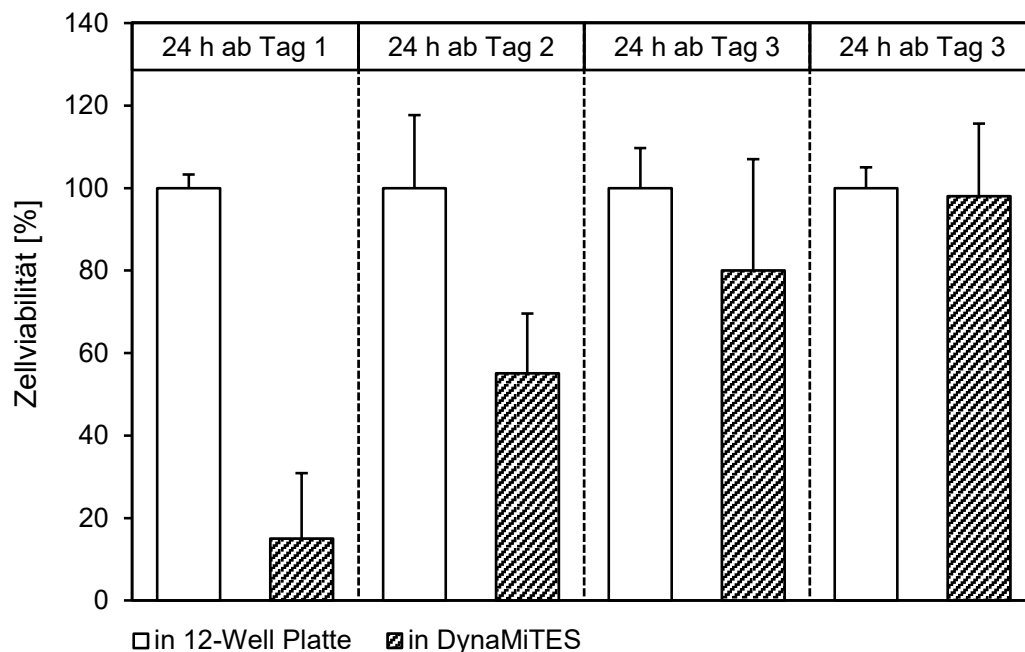


Abbildung 28: Zellviabilitäten von hCMEC/D3 Zellen mittels MTT-Assay nach einer dynamischen Kultivierung im DynaMiTES (Prototyp 2) mit einer Flussrate von 0,03 ml/min für 24 h; die statisch kultivierten Kontrollzellen in der 12-Well-Platte wurden jeweils auf 100 % gesetzt. (n = 2 – 14); $M \pm SD$

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die Zellmonolayer vor dem Einsetzen ins DynaMiTES konfluent sein müssen, damit sich ihre Zellviabilität nach 24 h unter Flussbedingungen im Bereich der gemessenen Zellviabilität der Kontrollzellen befindet (Abbildung 28). Waren die Zellmonolayer hingegen an den ersten beiden Tagen subkonfluent, lag die Zellviabilität unter 60 %. Mögliche Gründe könnten sein, dass die Proliferationsrate im DynaMiTES reduziert ist oder sich bereits adhärierte Zellen durch die Flussbedingungen wieder von der Membran abgelöst haben. Eine Zellzahlanalyse wurde im Rahmen dieser Untersuchung nicht durchgeführt. Für die nachfolgenden Experimente wurde, sofern nicht anders angegeben, eine statische Vorkultivierungszeit von mindestens drei Tagen ausgewählt.

4.4.2 Zellkultivierung über 3 h und 24 h

Die Zellen wurden für 3 h bzw. 24 h statisch und dynamisch im DynaMiTES kultiviert. Der Kultivierungszeitraum von 3 h wurde in Anlehnung an den Permeationszeitraum von Beißner et al. untersucht (Beißner et al. 2018). Nach dem Herausnehmen aus dem DynaMiTES und dem Überführen in eine 12-Well-Zellkulturplatte wurden die Zellen auf ihre Zellkonfluenz, Zellviabilität, Zellzahl und Barriereeigenschaften untersucht.

4.4.2.1 Einfluss auf die Zellviabilität und die Zellkonfluenz

Die statische und dynamische Kultivierung über einen Zeitraum von 3 h wurde von den Endothelzellen gut vertragen, erkennbar an den unveränderten Zellzahlen und Zellviabilitäten im Vergleich zu den Kontrollzellen (Tabelle 25). Eine Kultivierungszeit von 24 h im DynaMiTES wurde bei einer Flussrate von 0,03 ml/min ebenfalls gut vertragen. Demgegenüber verursachten höhere Flussraten von 0,33 und 3,33 ml/min einen deutlichen Zellzahlverlust. Zusätzlich kam es durch die höheren Druckverhältnisse zu einem verstärkten Auslaufen des Mediums und zu Luftblasenbildungen im Donor-Kompartiment. Ob die Zellzahlreduktion im DynaMiTES bei den höheren Flussraten auf eine Unterversorgung mit Medium zurückzuführen ist, sollte durch eine Kultivierung in der 12-Well-Zellkulturplatte ohne Medium im Donor-Kompartiment überprüft und so der Luft-Zell-Kontakt nachgebildet werden.

Hierbei waren bei der mikroskopischen Untersuchung keine Zellablösungen oder Veränderungen des Monolayers erkennbar, und bei der Zellzahlanalyse wurde eine Zellzahl von $84,7 \pm 3,3$ % im Vergleich zu den Kontrollzellen mit Medium ermittelt. Das spricht dafür, dass die Zellzahlreduktion im DynaMiTES bei den höheren Flussraten nicht allein auf eine Unterversorgung mit Medium zurückzuführen ist. Auf die Undichtigkeiten des DynaMiTES wird im Abschnitt 4.4.3.3 näher eingegangen.

Tabelle 25: Übersicht der Zellzahlen, Zellviabilitäten (MTT-Assay) und der Zellmembranintegritäten (Trypanblaufärbung) von hCMEC/D3 Zellen nach unterschiedlichen Kultivierungsvariationen ab Tag 4: statisch in der 12-Well-Zellkulturplatte (3 h, n = 16 – 20; 24 h, n = 3 – 22), statisch im DynaMiTES (3 h, n = 17 – 21; 24 h n = 3 – 16), bei 0,03 ml/min (3 h, n = 3; 24 h, n = 3 – 9), 0,33 ml/min (3 h, n = 6 – 10; 24h, n = 5) und 3,33 ml/min (3 h, n = 8; 24 h, n = 4) im DynaMiTES; die Prozentangaben beziehen sich auf die Kontrollzellen in den 12-Well-Zellkulturplatten. Fett gedruckte Zahlen markieren Werte unter 80 %. *M* \pm *SD*; # = DynaMiTES sehr stark ausgelaufen

Kultivierungsvariation	Zellzahl [%]	Zellviabilität [%]	Zellmembranintegrität [%]
3 h Kultivierung			
Statisch in 12-Well-Platte	100,0 \pm 17,4	100,0 \pm 13,6	-
Statisch im DynaMiTES	103,2 \pm 28,1	107,8 \pm 31,3	-
0,03 ml/min im DynaMiTES	96,7 \pm 20,2	101,9 \pm 26,6	-
0,33 ml/min im DynaMiTES	110,6 \pm 12,2	110,2 \pm 29,7	-
3,33 ml/min im DynaMiTES	114,5 \pm 21,4	109,3 \pm 29,4	-
24 h Kultivierung			
Statisch in 12-Well-Platte	100,0 \pm 23,6	100,0 \pm 15,6	100,0 \pm 3,2
Statisch im DynaMiTES	97,3 \pm 29,3	85,2 \pm 14,1	107,3 \pm 0,3
0,03 ml/min im DynaMiTES	92,3 \pm 29,0	82,0 \pm 22,3	103,4 \pm 6,6
0,33 ml/min im DynaMiTES #	78,6 \pm 26,6	-	95,2 \pm 6,2
3,33 ml/min im DynaMiTES #	44,8 \pm 25,7	-	97,1 \pm 4,6

Zur weiteren Charakterisierung des Monolayers wurden die Endothelzellen nach einer 24-stündigen Kultivierung im DynaMiTES bei 0,03 ml/min mit Fluoreszenzfarbstoffen zur Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen untersucht (Abschnitt 3.2.8.5.1). Abbildung 29 zeigt deutlich, dass es keine erkennbaren Unterschiede zwischen dem statisch (A – D) und dynamisch (E + F) kultivierten Endothelzellen gibt. Die Zellen wiesen einen konfluenten Monolayer mit überwiegend vitalen Zellen und einer unveränderten Zellmorphologie auf.

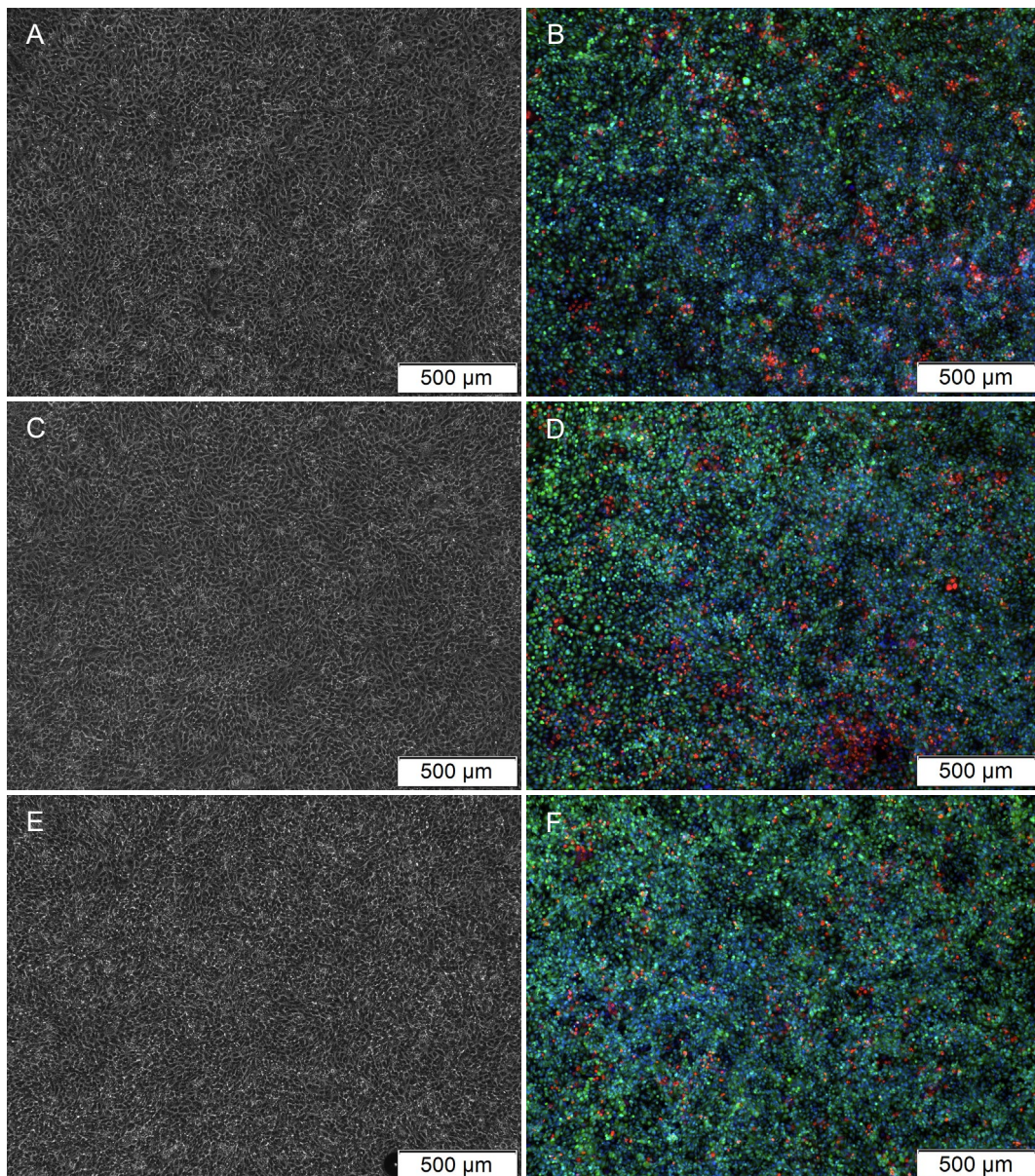


Abbildung 29: Mikroskopische Aufnahmen von hCMEC/D3 nach 24 h unter verschiedenen Kultivierungsvariationen: statische Kultivierung in der 12-Well-Platte (A, B), statische Kultivierung im DynaMiTES (C, D) und dynamische Kultivierung mit einem Fluss von 0,03 ml/min (E, F); *links*: lichtmikroskopische Aufnahmen mit Phasenkontrast; *rechts*: Zellen nach Lebend/Tot-Färbung mit Calcein (grün), PI (rot) und Hoechst 33342 (blau)

4.4.2.2 Einfluss auf die Barriereigenschaften

Zur Untersuchung der Barriereigenschaften, wurden Permeationsuntersuchungen mit Natriumfluoreszein im DynaMiTES nach 24 h Zellkultivierung durchgeführt. Die Flussbedingungen während der Permeation entsprachen denen der Zellkultivierung. Um eine konstante Konzentration im Donor-Kompartiment auch bei den statisch kultivierten Zellen im DynaMiTES sicherzustellen, wurde in regelmäßigen Abständen Natriumfluoreszein-Lösung ins Donor-Kompartiment nachgefüllt. Die Permeationsverläufe und Permeationskoeffizienten (Abbildung 30, Tabelle 26) verdeutlichen, dass es keinen Unterschied zwischen einer Permeation im DynaMiTES und in der 12-Well-Zellkulturplatte gibt. Die vorangegangene DynaMiTES-Kultivierung hatte weder unter den statischen noch unter den dynamischen Bedingungen einen Einfluss auf die Barriereigenschaften der Endothelzellen. Im DynaMiTES ist bei der statischen Permeation ein leichtes Abflachen der Kurve zu erkennen. Das zeigt deutlich, dass ein häufigeres Nachfüllen der Natriumfluoreszein-Lösung ab Minute 100 erforderlich wäre. Die TEER-Werte der Endothelzellen befanden sich nach der Kultivierung alle in einem Bereich $\leq 15 \Omega \cdot \text{cm}^2$.

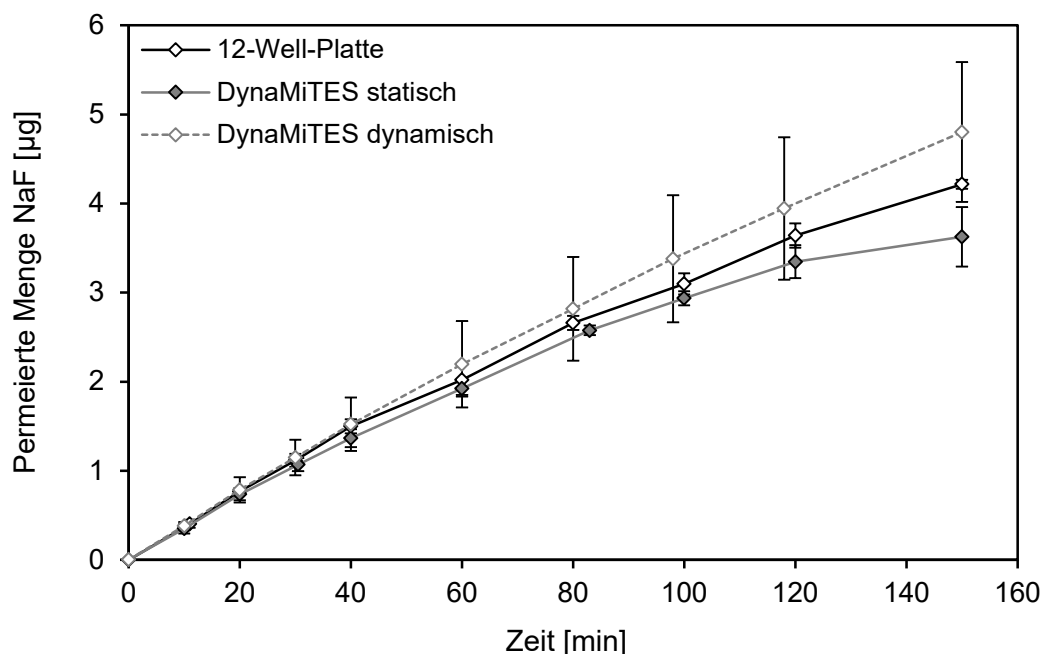


Abbildung 30: Permeationsverläufe von Natriumfluoreszein (25 µg/ml) durch einen hCMEC/D3 Monolayer über einen Zeitraum von 150 min nachdem die Zellen zuvor 24 h statisch bzw. bei 0,03 ml/min im DynaMiTES kultiviert wurden; die Kontrollzellen wurden in der 12-Well-Zellkulturplatte permeiert. (n = 4); $M \pm SD$

Tabelle 26: Fluxdaten und Permeationskoeffizienten von Natriumfluoreszein nach 24 h Kultivierung der hCMEC/D3 Zellen im DynaMiTES und in 12-Well-Zellkulturplatten ($n = 4$); $M \pm SD$

Permeationsmodell mit 25 $\mu\text{g/ml}$ NaF	Flux $J [\cdot 10^{-4} \mu\text{g/cm}^2 \cdot \text{s}]$	Permeationskoeffizient $P_{\text{app}} [\cdot 10^{-5} \text{cm/s}]$
24 h Kultivierung		
Statisch in 12-Well-Platte	$4,88 \pm 0,16$	$1,95 \pm 0,06$
Statisch im DynaMiTES	$4,72 \pm 0,13$	$1,89 \pm 0,05$
0,03 ml/min im DynaMiTES	$5,26 \pm 0,12$	$2,10 \pm 0,47$

4.4.3 Zellkultivierung über einen Zeitraum von ≥ 72 h

4.4.3.1 Kontaminationen im DynaMiTES

Im DynaMiTES traten bei längeren Kultivierungszeiten (≥ 48 h) häufig mikrobiologische Kontaminationen auf, wohingegen die Kontrollzellen in der 12-Well-Zellkulturplatte unter den identischen Bedingungen keine aufwiesen. Eine verlängerte Einwirkzeit des 70%igen (V/V) Ethanol von 5 Minuten auf die DynaMiTES-Ebenen brachte keine Verbesserung. Dem Medium CO₂-IDM wurde routinemäßig eine Lösung aus den Antibiotika Penicillin und Streptomycin sowie dem Antimykotikum Amphotericin B zugesetzt. Diese Antibiotika-Lösung deckt ein großes Wirkspektrum ab und zählt in der Zellkultur zu einer der am häufigsten eingesetzten Antibiotika-Kombinationen (Ryu et al. 2017). Das β -Lactam-Antibiotikum Penicillin greift durch irreversible Interaktion mit der Transpeptidase in die Peptidoglykansynthese von grampositiven Bakterien ein und tötet diese dadurch ab (Mucsi et al. 2013; Izaki et al. 1966). Das Aminoglykosid-Antibiotikum Streptomycin hemmt hingegen die Proteinbiosynthese der Bakterien durch Blockierung der Initiation und weist ein breites Wirkungsspektrum vor allem gegen gramnegative Bakterien auf (Sharma et al. 2007; Luzzatto et al. 1968). Kontaminationen mit Bakterien, Pilzen und Mykoplasmen trotz Antibiotikazugabe können durch eine zu niedrige Antibiotikakonzentration im Medium, durch chemische Instabilitäten oder durch die Ausbildung von Antibiotikaresistenzen zustande kommen. Die verwendete Antibiotika-Lösung wurde in der empfohlenen Endkonzentration von 100 Units/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin

eingesetzt und ist laut Herstellerangaben über einen Zeitraum von drei Tagen bei 37 °C stabil. Wurde das Medium CO₂-IDM durch das Standardmedium EGM-2 ausgetauscht, traten weder in der 12-*Well*-Zellkulturplatte noch im DynaMiTES Kontaminationen auf. Dieses Phänomen lässt sich durch eine unterschiedliche Antibiotikazugabe zu den jeweiligen Medien erklären. In EGM-2 ist nach Herstelleranweisung das Aminoglykosid-Antibiotikum Gentamicin zugesetzt, das ein breiteres Wirkspektrum als Penicillin/Streptomycin aufweist und zudem über 5 Tage bei 37 °C stabil ist (Rudin et al. 1970). Es hemmt durch eine Anlagerung an die 30 S-Untereinheit des Ribosoms die Proteinbiosynthese von gramnegativen und grampositiven Bakterien sowie Mykobakterien (Kadurugamuwa et al. 1993; Rudin et al. 1970). Bei einer zusätzlichen Gabe von 50 µg/ml Gentamicin ins Medium CO₂-IDM trat kein mikrobiologisches Wachstum im DynaMiTES auf (Tabelle 27). Um darüber hinaus eine Kontamination unabhängig von der Antibiotikazugabe auszuschließen, wurde nach einer passenden Sterilisationsmethode für das DynaMiTES gesucht.

Das Grundkörpermaterial Polycarbonat hat eine amorphe bis gering kristalline Struktur und ist gekennzeichnet durch Transparenz, Formstabilität, mechanische Festigkeit sowie eine Hitzebeständigkeit bis 130 °C (Brunelle 2005). Aufgrund dieser Eigenschaften und seiner guten Biokompatibilität wird das Material häufig in Biomedizinprodukten wie Spritzen, chirurgischen Instrumenten und Dialysegeräten verarbeitet (Sastri 2014). Die mittleren DynaMiTES-Ebenen wurden mit gespanntem, gesättigten Wasserdampf unter Standardbedingungen (121°C, 15 min, 2 bar) autoklaviert. Physikalische Veränderungen z. B. durch Hydrolyse-Reaktionen werden in der Literatur häufig erst nach mehreren Zyklen beschrieben (Sastri 2014; Rogers 2013). In der vorliegenden Arbeit wurden auch nach mehr als 15 Autoklavierzyklen keine makroskopischen Veränderungen festgestellt, wobei keine systematische Untersuchung hinsichtlich der Zyklenanzahl und der Materialeigenschaften durchgeführt wurde. Die verklebte Silikonfolie auf der mittleren Ebene wies nach dem Autoklavierprozess teilweise kleine, reversible Lufteinschlüsse auf. Die untere Ebene mit den integrierten Elektroden und Anschlüssen wurde versuchsweise ebenfalls autoklaviert. Das Elektrodenmaterial Edelstahl ist gegenüber Temperaturen bis 250 °C beständig. Nach der Autoklavierung kam es an den integrierten Elektrodenanschlüssen zu einer braunen Verfärbung, die auf eine

Korrosion schließen lässt. Daher wurde eine standardmäßige Sterilisation mit gesättigtem Wasserdampf für die obere und untere Ebene ausgeschlossen und die Sterilisation mit trockener Hitze untersucht. Um die Trockenhitzesterilisation bei einer materialverträglichen Temperatur (120 °C) durchführen zu können, wurde die Sterilisationsdauer auf 32 h verlängert. Die untere DynaMiTES-Ebene zeigte sich nach der Sterilisation, bis auf eine Verfärbung des Klebers an der Elektrode, unverändert (Anhang 9.2).

Neben den thermischen Verfahren ist die Strahlensterilisation mit energiereichen Elektronenstrahlen (Beta-Sterilisation) bzw. mit elektromagnetischen Wellen (Gamma-Sterilisation) eine zuverlässige Sterilisationsmethode. Während die Beta-Sterilisation eine relativ geringe Eindringtiefe aufweist und eher für Oberflächensterilisationen geeignet ist, hat die Gamma-Sterilisation mit den ungeladenen Photonen eine hohe Eindringtiefe. Die Bestrahlungsuntersuchungen erfolgten in einem spezialisierten Bestrahlungsbetrieb mit Hilfe einer Kobalt-60-Quelle bei einer Strahlendosis von 25 kGy. Ein DynaMiTES wurde jeweils auseinander- und zusammengebaut mit Beta-Strahlung behandelt. Nach der Behandlung wiesen die Polycarbonat-Grundkörper eine Verfärbung auf. Bei dem auseinandergebauten System war eine kontinuierliche und schwache Gelbfärbung zu erkennen, wohingegen sich bei dem zusammengebauten DynaMiTES ein gradueller Verlauf von gelb nach schwach gelb abzeichnete und sich zusätzlich Mikrorisse gebildet hatten. Der graduelle Verlauf lässt sich bei dem zusammengebauten System durch eine abnehmende Eindringtiefe der Strahlen erklären. Im Unterschied dazu verfärbte sich das zusammengebaute DynaMiTES nach der Gamma-Strahlensterilisation einheitlich gelb (Anhang 9.2).

Eine Zusammenfassung aller Untersuchungsvariationen ist in Tabelle 27 aufgelistet. Es wurden Sterilisationsverfahren berücksichtigt, die im Rahmen dieser Arbeit technisch umsetzbar waren. Daher wurden z. B. die Anwendbarkeit einer Niederdruck-Plasmasterilisation oder die Begasung mit Ethylenoxid nicht untersucht.

Tabelle 27: Zusammenfassung der Kontamination und Materialveränderung des DynaMiTES nach verschiedenen Untersuchungsvariationen: Reinigung mit Ethanol und anschließende Anwendung mit CO₂-IDM bzw. EGM-2, Autoklavierung, Trockenhitzeesterilisation und Strahlensterilisation; bei den standardisierten Verfahren wurde, mit Ausnahme der β -Strahlensterilisation, keine Prüfung auf eine Kontamination durchgeführt. PC = Polycarbonat

Variationen	Kontamination	Material- veränderung
Mit Ethanol gereinigt und gespült		
– in CO ₂ -IDM	Ja	-
– in EGM-2	Nein	-
– in CO ₂ -IDM + 50 µg/ml Gentamicin	Nein	-
Autoklavierung (121°C, 15 min, 2 bar)	-	Korrosion Elektrodenanschluss
Trockenhitzeesterilisation (32 h, 120 °C)	-	Verfärbung des Klebers
β -Strahlensterilisation (25 kGy)	Nein	Verfärbung PC & Risse
γ -Strahlensterilisation (25 kGy)	-	Verfärbung PC

4.4.3.2 pH-Veränderungen im DynaMiTES

Der pH des Zellkulturmediums ist entscheidend für eine optimale Kultivierungsumgebung der Zellen. Veränderungen können die Zellfunktionen, darunter die Zellproliferation und -differenzierung sowie den Zellmetabolismus beeinflussen (Mackenzie et al. 1961). Aufgrund der geringen Gasdurchlässigkeit des Polycarbonats spielt der pH-Wert insbesondere bei den längeren Kultivierungszeiträumen im DynaMiTES eine wichtige Rolle. Der physiologische pH-Wert der Extrazellulärflüssigkeit liegt zwischen 7,35 und 7,45. Abweichungen unterhalb und oberhalb dieses Bereichs werden als Azidose bzw. Alkalose bezeichnet (Knichwitz 2005). Äquivalent dazu haben die meisten Säugetierzellen *in vitro* ihr pH-Optimum bei 7,4, wobei dieses abhängig vom jeweiligen Zelltyp variieren kann. Transformierte Zelllinien haben z. B. ihr pH-Optimum bei leicht sauren pH-Werten (7,0 – 7,4), wohingegen normale Fibroblastenzelllinien leicht basische pH-Werte (7,6 – 7,8) bevorzugen (Eagle 1973; Ceccarini und Eagle 1971).

Um die pH-Werte im Zellkulturmedium konstant zu halten, werden häufig der physiologische Hydrogencarbonat-Kohlensäure-Puffer oder der synthetische HEPES-Puffer eingesetzt (Freshney 2010; Ceccarini und Eagle 1971; Eagle 1971). Bei der Verwendung des Hydrogencarbonat-Kohlensäure-Puffers ist zur Einstellung des

physiologischen pH-Wertes eine Umgebung mit 5 bis 10 % CO₂ erforderlich. Bei längeren Arbeiten außerhalb der CO₂-regulierten Umgebung können pH-Schwankungen auftreten, welche die Zellfunktion beeinträchtigen können. (Itagaki und Kimura 1974). Beispielsweise stellt das Zellkulturmedium CO₂-IDM von Gibco™ mit einem CO₂-unabhängigen Puffer für die Kultivierung unter atmosphärischen Bedingungen eine Alternative dar (Abschnitt 4.3.2.2).

Tabelle 28: pH-Werte in der 12-Well-Zellkulturplatte oder im DynaMiTES in den Zellkulturmedien EGM-2 und CO₂-IDM mit und ohne CO₂-Austausch; die Messung erfolgte ohne Zellen nach 48 h (n = 4 – 6). Bei den Versuchen mit Zellen wurden Inkubationszeiträume von 24 und 72 h untersucht und zusammengefasst. (n = 5 – 12); $M \pm SD$

Versuchsaufbau	pH-Werte
Ohne Zellen	
12-Well-Platte mit EGM-2 und CO ₂ -Austausch	7,3 ± 0,0
DynaMiTES mit EGM-2 und CO ₂ -Austausch	7,3 ± 0,0
DynaMiTES mit EGM-2 ohne CO ₂ -Austausch	7,7 ± 0,2
Mit Zellen	
12-Well-Platte mit EGM-2 und CO ₂ -Austausch	7,4 ± 0,1
DynaMiTES mit EGM-2 und CO ₂ -Austausch	7,4 ± 0,2
12-Well-Platte mit CO ₂ -IDM ohne CO ₂ -Austausch	7,1 ± 0,1
DynaMiTES mit CO ₂ -IDM ohne CO ₂ -Austausch	7,0 ± 0,2

Für die Ermittlung der pH-Werte im dynamischen Zellkultursystem wurde das Standardmedium EGM-2 jeweils mit und ohne CO₂-Zufuhr sowie das Medium CO₂-IDM ohne CO₂-Zufuhr untersucht (Tabelle 28). Ein CO₂-Austausch wurde im DynaMiTES ermöglicht, indem die obere DynaMiTES-Ebene gegen den gaspermeablen Verschluss einer Zellkulturflasche (75 cm²) ausgetauscht wurde. Die pH-Werte von EGM-2 in der 12-Well-Zellkulturplatte und im DynaMiTES waren bei den Versuchen mit CO₂-Austausch vergleichbar. Wurde hingegen das DynaMiTES mit der oberen DynaMiTES-Ebene verschlossen, verschob sich der pH-Wert von EGM-2 leicht in den alkalischen Bereich. Das verdeutlicht, dass ein Gasaustausch im zusammengebauten DynaMiTES reduziert war und weniger CO₂ mit dem Medium interagieren konnte. Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass der pH-Wert von Hydrogencarbonat-gepufferten Medien ohne CO₂ bereits nach 30 Minuten auf 7,9 (Vistica et al. 1990) bzw. nach 1 h auf 8,4 (Lelong und Rebel 1998) anstieg. Im Vergleich zu

diesen Ergebnissen war der pH-Wert von 7,7 im DynaMiTES niedriger. Das spricht dafür, dass ein gewisser CO₂-Austausch über die gaspermeablen PTFE-Schläuche stattfand. Die pH-Werte von dem Medium CO₂-IDM lagen leicht unter den pH-Werten des Standardmediums EGM-2. Die pH-Messung erfolgte nach dem Herausnehmen aus dem Inkubator und dem Überführen in eine 12-Well-Zellkulturplatte unter atmosphärischen Bedingungen bei Raumtemperatur (23 ± 2 °C). Es ist zu erwarten, dass die realen pH-Werte in einer CO₂-reichhaltigen Atmosphäre leicht von den gemessenen Werten abweichen. Mackenzie et al. beispielsweise ermittelten unter ähnlichen Bedingungen eine pH-Abweichung von 0,1 (Mackenzie et al. 1961).

4.4.3.3 Undichtigkeiten des DynaMiTES

Während der länger andauernden Kultivierung der Zellen im DynaMiTES traten vermehrt Undichtigkeiten im System auf, erkennbar an dem sinkenden Volumen im Akzeptor-Kompartiment und der Luftblasenbildung im Donor-Kompartiment (Abbildung 31, A + B). Mit Hilfe einer Natriumfluoreszein-Lösung wurden die undichten Stellen an den seitlichen Hülsen lokalisiert (Abbildung 31, C). Das deutet darauf hin, dass die Dichtungsringe innerhalb der Hülsen den Kanal nicht ausreichend abdichten. Diese Fehlerquelle wurde durch die Verwendung eines größeren Dichtungsrings innerhalb der Hülse deutlich minimiert. Der neue Dichtungsring drückt sich näher an den Kanal und sorgt somit für eine bessere Abdichtung. Weitere Abdichtungsvariationen, wie z. B. eine zusätzliche oder dickere Silikonfolie zwischen der mittleren und der unteren Ebene, bewirkten keine Verbesserung.

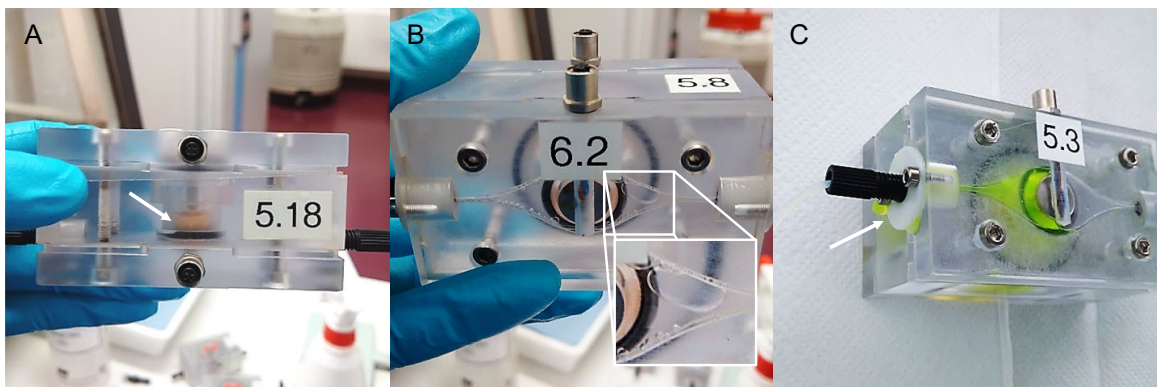


Abbildung 31: Halb leeres Akzeptor-Kompartiment (A), Luftblasen im Donor-Kompartiment (B) und Herauslaufen einer NaF-Lösung (250 µg/ml) entlang der seitlichen Hülse bei einem um 180° gedrehten DynaMiTES (C)

Ein weiterer Ansatz zur Verbesserung der Undichtigkeiten war das permanente Verkleben der mittleren und unteren Ebenen. Hierfür wurden ein Abdichtungskleber aus Silikon sowie eine beidseitig klebende Acrylatfolie getestet. Beide Materialien zeigten in einer Zellviabilitätsstudie gute Zellverträglichkeiten (Daten nicht gezeigt) und ermöglichten die vollständige Abdichtung des Systems. Durch das permanente Verkleben wird die Reinigung des DynaMiTES deutlich erschwert, verbunden mit einem erhöhten Kontaminationsrisiko.

4.4.3.4 Einfluss auf die Zellkonfluenz und die Zellviabilität

Die vorherigen Ergebnisse wurden für die Optimierung des Versuchsaufbaus genutzt. So wurde für die 72-stündige Kultivierung im DynaMiTES zur Sicherstellung einer optimalen Nährstoffversorgung der Endothelzellen eine Kultivierung im Standardmedium EGM-2 im Zellkulturinkubator mit einem CO₂-Gehalt von 5 % (V/V) einer Kultivierung in CO₂-IDM unter luftatmosphärischen Bedingungen (0,04 % CO₂) vorgezogen (Abschnitt 3.2.8.2). Durch größere Dichtungsringe in den seitlichen Hülsen und die Anwendung von Flussraten unter 0,33 ml/min wurden die Undichtigkeiten des DynaMiTES minimiert (Abschnitt 4.4.3.3). Traten dennoch Undichtigkeiten auf, wurde das betroffene System aus der Bewertung genommen.

In den mikroskopischen Untersuchungen zeigten die konfluenten Zellmonolayer nach einer Kultivierung im DynaMiTES bei einer Flussrate von 0,03 ml/min ein heterogeneres Erscheinungsbild als die Kontrollzellen (Abbildung 32). Nach einer Kultivierung im DynaMiTES traten häufiger abgerundete Zellen auf. Zudem wurden bei den Monolayern im DynaMiTES vor allem nach einer dynamischen Kultivierung teilweise Zellüberwucherungen (Abbildung 32, F) festgestellt. Dieser Effekt könnte auf das höhere Nährstoffangebot bei einer dynamischen Kultivierung zurückzuführen sein. Mikroskopisch konnte keine Veränderung der Zellmorphologie festgestellt werden.

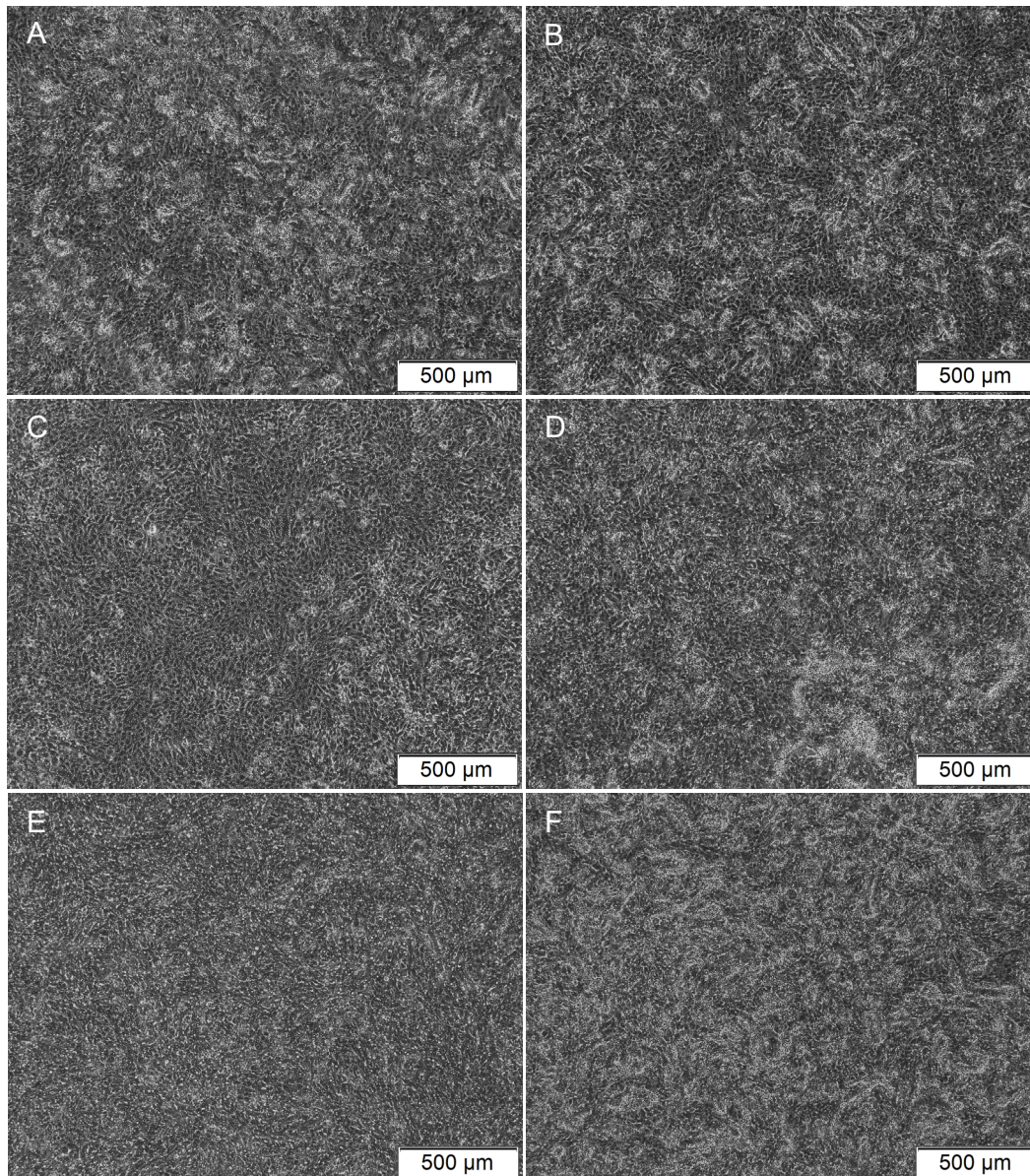


Abbildung 32: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen exemplarisch von jeweils zwei Zellkultureinsätzen mit hCMEC/D3 Zellen nach 72 h Kultivierung: statisch in der 12-Well-Zellkulturplatte (A+B), statisch im DynamiTES (C+D), dynamisch (0,03 ml/min) im DynamiTES (E+F) mit z. T. Zellüberwucherungen (F)

Die Ergebnisse nach einer 72-stündigen Zellkultivierung im DynamiTES sind in Tabelle 29 aufgelistet. Hierbei sind bei einem Vergleich der Zellen hinsichtlich ihrer Membranintegrität und der Zellzahl keine Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen erkennbar. Die mitochondriale Aktivität ist nach einer statischen Kultivierung im DynamiTES leicht reduziert, was sich auf das geringere Volumen an Zellkulturmedium und damit einhergehend einen schnelleren Nährstoffverbrauch zurückführen lässt. Die höheren Standardabweichungen bei den Ergebnissen nach einer dynamischen Kultivierung bestätigen die heterogenen Ergebnisse aus den mikroskopischen Untersuchungen.

Tabelle 29: Zellzahlen, Zellviabilitäten (MTT-Assay) und Zellmembranintegritäten (Trypanblaufärbung) von hCMEC/D3 Zellen: statisch in der 12-Well-Zellkulturplatte ($n = 4 - 8$), statisch im DynaMiTES ($n = 4 - 8$) und bei einem Fluss von 0,03 ml/min im DynaMiTES ($n = 4 - 8$); die Prozentangaben beziehen sich auf die Kontrollzellen in den 12-Well-Zellkulturplatten. $M \pm SD$

Kultivierungsvariation	Zellzahl [%]	Zellviabilität [%]	Zellmembranintegrität [%]
72 h Kultivierung			
Statisch in 12-Well-Platte	$100,0 \pm 13,3$	$100,0 \pm 6,4$	$100,0 \pm 2,4$
Statisch im DynaMiTES	$103,9 \pm 7,2$	$74,7 \pm 5,5$	$99,8 \pm 4,5$
0,03 ml/min im DynaMiTES	$105,5 \pm 15,8$	$94,0 \pm 21,3$	$97,9 \pm 7,5$

4.4.3.5 Einfluss auf die Zellumgebung und die Barriereintegrität

Nach einer Kultivierung über 72 h wurden die Barriereigenschaften der hCMEC/D3 Zellen sowie der pH-Wert und die Temperatur des Mediums untersucht (Tabelle 30). Die Temperatur sowie der pH-Wert nach der statischen Zellkultivierung im DynaMiTES sind vergleichbar mit den Werten der herkömmlichen Kultivierung. Während der dynamischen Kultivierung im DynaMiTES verschob sich der pH-Wert in den schwach alkalischen Bereich, was auf einen unzureichenden CO₂-Austausch hindeutet. Eine Ursache könnte sein, dass die gaspermeablen PTFE-Verbindungsschläuche zu den Spritzenpumpen zum Teil außerhalb der CO₂-regulierten Atmosphäre verliefen.

Die dynamische Kultivierung hatte keinen Effekt auf die Barriereintegrität der Endothelzellen, erkennbar an den unveränderten TEER-Werten. Die Permeationsuntersuchungen mit Natriumfluoreszein-Lösung wurden im Rahmen der Kokultivierung nach einer dynamischen Kultivierung durchgeführt (Abschnitt 4.4.3.6).

Tabelle 30: Ergebnisse der Zellumgebung (pH, Temp.; $n = 6 - 8$) und Barriereintegrität (TEER; $n = 5 - 8$) von hCMEC/D3-Zellen nach 72 h Kultivierung; die Kultivierung erfolgte statisch in einer 12-Well-Zellkulturplatte (Kontrollzellen) sowie statisch bzw. dynamisch (0,03 ml/min) im DynaMiTES. $M \pm SD$

Kultivierungsbedingungen	pH	Temp. [°C]	TEER [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]
12-Well-Platte	$7,5 \pm 0,1$	$37,2 \pm 0,2$	$8,4 \pm 1,1$
DynaMiTES statisch	$7,4 \pm 0,0$	$37,1 \pm 0,2$	$9,9 \pm 2,5$
DynaMiTES dynamisch	$7,7 \pm 0,1$	$37,1 \pm 0,2$	$9,1 \pm 2,5$

4.4.3.6 Dynamische Ko-Kultivierung im DynaMiTES

Nach einer Vorkultivierungszeit von vier Tagen wurde das Ko-Kulturmodell in das DynaMiTES eingeführt und statisch sowie dynamisch (0,03 ml/min) für 72 h kultiviert (Abschnitt 3.2.8.1). Trotz der Verwendung von transparenten PET-Membranen war die mikroskopische Untersuchung bei dem Ko-Kulturmodell durch den beidseitigen Zellbewuchs der Membranen erschwert. Aus diesem Grund wurde die Konfluenz der jeweiligen Mono-Kulturen mikroskopisch untersucht und auf das Ko-Kulturmodell übertragen. Eine alternative Methode zur Untersuchung der Konfluenz wäre eine Zellkernfärbung, z. B. mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342, wobei jedoch die identischen Monolayer anschließend nicht für weitere Untersuchungen eingesetzt werden könnten.

Tabelle 31: TEER-Werte ($n = 4 - 12$) an Tag 4 und 7 sowie Permeationsdaten von NaF ($n = 6 - 14$) an Tag 7 von hCMEC/D3 und SVGmm (jeweils als Mono-Kultur und als Ko-Kultur) nach einer statischen und dynamischen (0,03 ml/min) Kultivierung über 72 h; $M \pm SD$

Kultivierungsbedingungen	TEER [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]	Flux J [$\cdot 10^{-4} \mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{s}$]	P _{app} [$\cdot 10^{-6} \text{cm}/\text{s}$]
12-Well-Platte Tag 4			
hCMEC/D3	$8,1 \pm 1,2$	-	-
SVGmm	$5,7 \pm 1,5$	-	-
hCMEC/D3 + SVGmm	$10,6 \pm 1,4$	-	-
12-Well-Platte Tag 7			
hCMEC/D3	$8,2 \pm 1,2$	$3,29 \pm 0,53$	$13,16 \pm 2,12$
SVGmm	$18,6 \pm 2,2$	$1,86 \pm 0,32$	$7,42 \pm 1,26$
hCMEC/D3 + SVGmm	$17,8 \pm 2,3$	$1,86 \pm 0,38$	$7,46 \pm 1,53$
DynaMiTES Tag 7			
hCMEC/D3 + SVGmm statisch	$16,2 \pm 3,7$	$1,66 \pm 0,50$	$6,65 \pm 2,01$
hCMEC/D3 + SVGmm dynamisch	$21,3 \pm 2,0$	$1,85 \pm 0,59$	$7,38 \pm 2,36$

Am vierten Tag befanden sich die TEER-Werte bei den Mono- und bei den Ko-Kulturen in einem Bereich $\leq 10 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Im Unterschied zu den Endothelzellen waren die Astrozyten zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig konfluent. Bis zum siebten Tag stieg der TEER-Wert bei der Astrozyten-Mono-Kultur und bei der Ko-Kultur

unabhängig von den Kultivierungsbedingungen deutlich an. Vergleichbar mit den Untersuchungen in Abschnitt 4.2.2 gab es zwischen den Ergebnissen der Astrozyten-Mono-Kultur und der Ko-Kultur keine wesentlichen Unterschiede (Tabelle 31). Die Untersuchungen verdeutlichen, dass eine Ko-Kultivierung im DynaMiTES realisierbar ist und die Astrozytenzelllinie innerhalb des Zellkultursystems weiter proliferiert. Ein positiver Einfluss der dynamischen Kultivierung auf die Barriereintegrität des Ko-Kulturmodells war nicht erkennbar.

4.4.3.7 Zellkultivierung im DynaMiTES ab der Einsaat

Bei einer Zellkultivierung im DynaMiTES direkt ab der Einsaat (Abschnitt 3.2.8.3) proliferierten die zunächst vereinzelt Zellen zu einem Zellmonolayer. Innerhalb des DynaMiTES erfolgte die Zellproliferation deutlich langsamer, erkennbar an den niedrigeren Zellzahlen (Tabelle 32). Eine Beeinflussung der Zellviabilität hinsichtlich der Zellmembranintegrität war nicht zu erkennen. Die Endothelzellen zeigten nach der DynaMiTES-Kultivierung ein heterogenes Erscheinungsbild, bei dem sich teilweise noch lichte Stellen im Zellrasen befanden. Eine Darstellung der phasenkontrastmikroskopischen Aufnahmen befindet sich im Anhang 9.4.

Tabelle 32: Zellzahl und Zellmembranintegrität (Trypanblaufärbung) von hCMEC/D3 an Tag 7 nach einer statischen Kultivierung in der 12-Well-Platte und im DynaMiTES ab der Einsaat ($n = 5 - 7$); $M \pm SD$

Kultivierungsbedingungen	Zellzahl [$\cdot 10^{-5}$ Zellen/ml]	Zellmembranintegrität [%]
12-Well-Platte	$13,8 \pm 2,3$	$88,8 \pm 2,5$
DynaMiTES statisch	$5,9 \pm 1,1$	$86,0 \pm 2,1$

4.4.4 Zusammenfassende Diskussion zur Kultivierung von hCMEC/D3 Zellen im *Cerebral* DynaMiTES

Durch den modularen Aufbau und das Einsteckprinzip des DynaMiTES ist eine Einsaat mit einer definierten Zelldichte unter herkömmlichen Versuchsbedingungen möglich. So lassen sich das dynamische Zellkultursystem und die 12-Well-Zellkulturplatte unabhängig von der Einsaateffizienz vergleichen. Eine dynamische Kultivierung von subkonfluenten Zellmonolayern über einen Zeitraum von 24 h führte im Vergleich zu den Kontrollzellen zu einer verringerten Zellviabilität. Frühere Studien haben gezeigt, dass die Expression einiger Adhäsionsmoleküle mit der Zelldichte zusammenhängt (Stanley et al. 1995). Wahrscheinlich haben subkonfluente hCMEC/D3 Monolayer geringer ausgeprägte Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen und sind dadurch anfälliger gegenüber den dynamischen Bedingungen im DynaMiTES. Zum Unterstützen der These könnte zukünftig der identische Versuchsaufbau unter statischen Bedingungen im DynaMiTES wiederholt werden. Als Konsequenz bezüglich der dynamischen Untersuchungsergebnisse wurden die Zellen für die meisten Untersuchungen bis zur Konfluenz vorkultiviert und anschließend in das dynamische Zellkultursystem eingesetzt. Siddharthan et al. untersuchten die dynamische Kultivierung von hCMEC/D3 Zellen in einer Flusskammer mit einem ähnlichen Steckprinzip für Snapwell™ Zellkultureinsätze. Die Zellen wurden unter herkömmlichen Bedingungen für 24 bis 36 h vorkultiviert, bevor sie anschließend in die Flusskammer überführt wurden (Siddharthan et al. 2007).

Im Unterschied zu den Einstecksystemen ist die Einsaat bei den meisten mikrofluidischen Zellkultursystemen ein dynamischer Prozess, bei dem die Zellsuspension über Verbindungsschläuche in das Zellsystem eingebracht wird. Die Herausforderung besteht darin eine definierte Zelldichte einzusäen, da diese die Zelleigenschaften beeinflusst (Kim et al. 2007; Stanley et al. 1995). Häufig folgte nach der Einführung der Zellsuspension eine statische Kultivierungszeit, um die Zelladhäsion zu ermöglichen. Die Dauer variierte abhängig vom Zelltyp, von der Zelldichte, den Oberflächeneigenschaften sowie vom Nährstoffverbrauch des Mediums zwischen 1 bis 24 h (Mannino et al. 2015; Reinitz et al. 2015; Bettinger et al. 2005; Hung et al. 2005) und mehreren Tagen (Brown et al. 2018; Partyka et al. 2017; DeStefano et al. 2017; Walter et al. 2016).

Beißner et al. berichteten über eine gute Zellverträglichkeit nach einer dreistündigen Kultivierung des Hemicornea-Konstrukts im DynaMiTES unter Anwendung von Flussraten bis 0,15 ml/min (Beißner et al. 2016). Dieses Ergebnis wurde in der vorliegenden Arbeit insofern bestätigt, als dass Flussraten bis 3,33 ml/min bei einer dreistündigen Kultivierung der hCMEC/D3 Zelllinie im DynaMiTES zu keiner Einschränkung der Zellzahl und der Zellviabilität führten. Andere Ergebnisse lieferte die dynamische Kultivierung der hCMEC/D3 Zellen über einen Zeitraum von 24 h. Die geringste Flussrate wurde von den Endothelzellen gut vertragen, erkennbar an den unveränderten Zell- und Barriereeigenschaften, wohingegen die Flussraten 0,33 und 3,33 ml/min zu einer starken Zellzahlreduzierung führten.

Durch die Strömung des Mediums entlang der luminalen Endothelzelloberfläche wird eine Reibungskraft, die laminare Scherkraft, erzeugt (Rochfort und Cummins 2019). Diese ist proportional zur Viskosität des Mediums und zur Flussrate bzw. umgekehrt proportional zu Höhe und Breite des Kanals (Gleichung 3.1). Die untersuchten Flussraten führten im DynaMiTES zu Scherspannungen von $3,9 \cdot 10^{-5}$ bis $3,9 \cdot 10^{-3}$ Pa. Bei den höheren Flussraten ist die Zellzahlreduktion der Endothelzellen möglicherweise auf die resultierenden höheren Scherbeanspruchungen zurückzuführen. Es ist bekannt, dass steigende Scherspannungen bei adhärennten Säugetierzellen zu sinkenden Zellviabilitäten und Zellzahlen führen können (Suwannaphan et al. 2015; van Kooten et al. 1994; Kretzmer und Schügerl 1991). Die hCMEC/D3 Zelllinie wurde allerdings bereits in verschiedenen Zellkulturmodellen bei höheren Scherspannungen kultiviert (Partyka et al. 2017; Griep et al. 2013; Cucullo et al. 2011b). Das weist darauf hin, dass neben der Scherbeanspruchung noch weitere Faktoren, wie z. B. die Luftblasenbildung im Donor-Kompartiment, verantwortlich für die Zellzahlreduktion im DynaMiTES sind. Sung und Shuler beobachteten nach dem Auftreten von Luftblasen in ihrem mikrofluidischen Zellkultursystem μ CCA veränderte Strömungsverhältnisse und ein Absterben der Zellen. Sie schlossen daraus, dass zum einen eine Unterversorgung mit Medium und zum anderen der direkte Kontakt mit den Luftblasen zum Zelltod geführt haben (Sung und Shuler 2009). Des Weiteren kann die ungleiche Verteilung der Luftblasen zu Druckunterschieden führen, die wiederum einen negativen Effekt auf die Zellen ausüben können (Schumacher et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden die Endothelzellen in der 12-Well-Zellkulturplatte

ohne Medium im Donor-Kompartiment kultiviert, um somit den Kontakt mit Luft nachzubilden. Der Zellmonolayer blieb mikroskopisch unverändert, was dafür spricht, dass die Zellzahlreduzierung nicht allein durch eine Unterversorgung mit Medium hervorgerufen wurde. Allerdings konnten mit diesem Ansatz weder das Vorhandensein einzelner Luftblasen noch die dynamischen Luft-Flüssigkeits-Grenzflächen imitiert werden. Luftblasen stören die Strömungsverhältnisse im mikrofluidischen Kanal und führen zu instabilen Kultivierungsbedingungen (Zheng et al. 2010; Prakash und Gershenfeld 2007). Um einen negativen Einfluss von Luftblasen auszuschließen und die Kultivierungsbedingungen im DynaMiTES konstant zu halten, ist die Dichtigkeit des Zellkultursystems äußerst wichtig. Aus diesem Grund wurde für die nachfolgenden Langzeitkultivierungsstudien nur die geringste Flussrate untersucht, bei der das System eine ausreichende Dichtigkeit aufwies. Des Weiteren wurde die Dichtigkeit des Systems durch die Verwendung eines größeren Dichtungsringes innerhalb der Hülsen deutlich verbessert. Zukünftig wäre es möglich Hülsen mit einer größeren Dichtungsaussparung herzustellen oder durch ein alternatives Dichtungsprinzip einen Einsatz der Hülsen zu umgehen. Ein weiterer kritischer Parameter ist der passgenaue Sitz der Silikonfolie. Der händische Zuschnitt und das Aufkleben der Folie führen häufig zu Ungenauigkeiten im Millimeterbereich. Um Abweichungen zu reduzieren, könnte eine Stanze das Zuschneiden der Silikonfolie vereinfachen.

Kultivierungszeiten über 48 h führten im DynaMiTES häufig zu mikrobiologischen Kontaminationen. Ein Zusatz von Penicillin/Streptomycin ins Medium zeigte keine ausreichende Wirkung, was auf eine Resistenzbildung gegenüber den eingesetzten Antibiotika schließen lässt. Eine Zugabe von Gentamicin verhinderte eine Kontamination über einen Zeitraum von mindestens 72 h. Um Resistenzinduktionen und Verschleppungen von geringen mikrobiologischen Kontaminationen zu vermeiden, sind eine zuverlässig aseptische Arbeitsweise und die Verwendung steriler Ausgangsmaterialien entscheidend. Eine Desinfektion mit 70 %igem Ethanol konnte die Kontamination des DynaMiTES unter einer herkömmlichen Antibiotikazugabe nicht verhindern. Leclerc et al. berichteten ebenfalls von einem Kontaminationsrisiko nach einer aufeinanderfolgenden Spülung aus Ethanol (70 %), demineralisiertem Wasser und Zellkulturmedium (Leclerc et al. 2003).

Für andere Mikrosysteme oder Schläuche wiederum erwies sich eine Reinigung mit 70 %igem Ethanol als ausreichend, wobei die jeweiligen Inkubationszeiten variierten (Lee et al. 2006; Kim et al. 2007). Die Wasserdampf-Sterilisation eignet sich zwar gut für die Sterilisierung der mittleren Ebene des DynaMiTES, für die obere und untere Ebene ist sie hingegen nur bedingt geeignet, da die Elektrodenanschlüsse korrodierten. Möglicherweise könnten korrosionsinhibierende Zusätze in den Autoklaven die Korrosionsgeschwindigkeit reduzieren (Bertolotti und Hurst 1978; Holmlund 1965). Im Vergleich zur Wasserdampfsterilisation wurde die Sterilisation durch trockene Hitze für einen Zyklus gut vertragen und das Polymer sowie die Elektroden zeigten makroskopisch keine Veränderungen. Nachteilig bei diesem Verfahren sind der notwendige Zeit- und der damit verbundene hohe Energieaufwand. Geringere Sterilisationszeiten (16 h) sollten bei einer Sterilisationstemperatur von 130 °C ebenfalls noch durchführbar sein. In zukünftigen Studien muss der Einfluss von Hitzesterilisationen auf die Materialien über mehrere Prozesszyklen untersucht werden.

Die Beta- und Gamma-Strahlensterilisation der DynaMiTES-Ebenen führte zu makroskopischen Veränderungen des Polycarbonats. Diese werden durch Vernetzungsreaktionen und Kettenbrüche der Carbonatgruppe sowie die Bildung von niedermolekularen, flüchtigen Radiolyseprodukten wie Kohlenmonoxid, Kohlendioxid und Wasserstoff hervorgerufen (Melo et al. 2007; Hama und Shinohara 1970). Die strahleninduzierte Gelbfärbung ist auf die Bildung von Phenoxylradikalen zurückzuführen. Diese werden in der Polymermatrix gehalten und absorbieren Licht im sichtbaren Bereich (Araújo et al. 1998). Abgesehen von der Gelbfärbung wurde nach der Gamma-Strahlensterilisation makroskopisch keine Veränderung des Polycarbonats beobachtet. In der Literatur zeigten Studien, dass sich trotz der einsetzenden Gelbfärbung die mechanischen Materialeigenschaften häufig erst bei Dosen von 50 bis 100 kGy verändern (Domininghaus et al. 2012; Melo et al. 2007; Araújo et al. 1998). Neben der Verwendung spezieller Tinte zur Farbkompensation gibt es die Möglichkeit ins Polymer verschiedene Stabilisatoren einzubauen (Sastri 2014; Clough et al. 1996). Im Unterschied zur Wirkung der Gamma-Strahlensterilisation wurden zusätzliche Mikrorisse nach der Beta-Strahlensterilisation im zusammengebauten DynaMiTES beobachtet.

Die pH-Untersuchungen verdeutlichen, dass sich der pH-Wert ohne einen möglichen CO₂-Austausch im DynaMiTES in den leicht alkalischen Bereich von 7,7 verschiebt. Dieser Bereich wird von vielen Säugetierzellen noch gut vertragen. Mackenzie et al. stellten dar, dass immortalisierte HeLa Zellen und Chang Leberzellen, sowie frisch isolierte Zellen aus der Leber und der Skelettmuskulatur von Ratten eine maximale Wachstumsrate innerhalb eines pH-Bereichs von 7,38 bis 7,87 aufweisen (Mackenzie et al. 1961). Eagle et al. stellten fest, dass die wenigsten Zelltypen bei einem pH von über 8 überleben, betonten aber gleichzeitig auch die individuellen Unterschiede der Säugetierzellen. Zudem haben einige spezialisierte Zellfunktionen ein pH-Optimum, das nicht zwangsläufig mit dem Optimum für das Zellwachstum übereinstimmt (Eagle 1973). Morshed und McMartin beispielsweise stellten eine pH-Abhängigkeit des TEER-Wertes nach einem Mediumwechsel fest, bei dem der optimale pH-Bereich bei 7,0 – 7,8 für HPT-Zellen liegt (Morshed und McMartin 1995). Um in der vorliegenden Arbeit einer Verschiebung des pH-Wertes in den alkalischen Bereich vorzubeugen, wurde während der Langzeitkultivierung die obere Ebene durch einen gaspermeablen Verschluss ausgetauscht. Das hatte zusätzlich den Vorteil, dass die Endothelzellen in ihrem Standardmedium EGM-2 kultiviert werden konnten.

Die Untersuchungen zeigten bei einer statischen bzw. dynamischen Kultivierung (0,03 ml/min) im DynaMiTES über einen Zeitraum von 72 h keinen Einfluss auf die Zellzahl und die Zellviabilität der Endothelzellen. Ebenso blieben die hCMEC/D3 Zellen unter Flussbedingungen morphologisch unverändert. Sie wiesen keine Elongation auf, wie es häufig bei Endothelzellen beobachtet wurde (Hur et al. 2012; Young und Simmons 2010; Noria et al. 2004). Dieses Ergebnis bestätigt vorherige Studien, die beschrieben, dass mikrovaskuläre Endothelzellen des Gehirns keinen klassischen Übergang von einer kubischen zu einer spindelförmigen Morphologie unter Scherbeanspruchung durchlaufen. Die Zellen richten sich, im Gegensatz zu vaskulären Endothelzellen anderer Organe, nicht nach der Flussrichtung aus und die Aktinfasern sind weiterhin zufällig in den Zellen orientiert, was auf einen nicht stattfindenden Umbau des Zytoskeletts hindeutet (DeStefano et al. 2017; Reinitz et al. 2015; Ye et al. 2014). Auf diese Weise gewährleisten die zerebralen Endothelzellen, dass die Länge der Tight Junctions pro Kapillarlängeneinheit und somit der parazelluläre Transport ins Gehirn minimiert sind (Ye et al. 2014). Allerdings wurden

im DynaMiTES, verglichen mit der genannten Literatur, größere Kanaldimensionen und geringere Flussraten eingesetzt. Die Größe der Kanäle ist ein entscheidender Faktor bei der Untersuchung von morphologischen Veränderungen. Gray et al. beobachteten beispielsweise anhand von bovinen Endothelzellen aus der Aorta eine zunehmende Elongation bei einer verringerten Kanalweite. Wurden die Zellen hingegen in Kanälen mit einer Weite von 225 μm statisch kultiviert, wurde kein Unterschied zu den Kontrollzellen festgestellt (Gray et al. 2002). Somit kann die fehlende Elongation der Endothelzellen in der vorliegenden Arbeit auf den zerebralen Ursprung sowie auf die Kanalweite von 15 mm zurückgeführt werden.

Nach einer Kultivierung im DynaMiTES wurde mikroskopisch ein heterogenes Erscheinungsbild der Monolayer festgestellt, bei dem z. T. Zellüberwucherungen oder Zellabrundungen auftraten. Diese Heterogenität könnte auf variierende kleine Luftblasenbildungen im System zurückzuführen sein. Obwohl bei der Langzeituntersuchung die Zellkultursysteme eine ausreichende Dichtigkeit aufwiesen, traten im Donor-Kompartiment zum Teil kleine Luftblasen auf. Die Aufnahme von Luft wurde wahrscheinlich durch die gaspermeablen PTFE-Schläuche verursacht, die aus technischen Gründen teilweise außerhalb des Inkubators verliefen. Vor allem bei den längeren Kultivierungszeiten von 72 h spielte dieser Effekt eine Rolle, da die Luftblasen ausreichend Zeit hatten, sich zu entwickeln. Um einer Gasbildung vorzubeugen, sollte zukünftig mit gasimpermeablen Schläuchen gearbeitet werden. Neben den Zelleigenschaften war die Entwicklung der Barriereigenschaften unter Flussbedingungen von besonderem Interesse. Flussraten von 0,03 bis 3,33 ml/min über einen Zeitraum von 3 h sowie die Flussrate von 0,03 ml/min über 72 h führten bei der hCMEC/D3 Zelllinie zu keiner Veränderung der TEER-Werte. Möglicherweise ist dieses Ergebnis auf die relativ geringe Scherspannung zurückzuführen, die sich mit einer Scherspannung von $3,9 \cdot 10^{-5}$ Pa unter den physiologischen Bedingungen (0,3 – 2 Pa) befindet (van der Helm et al. 2016a).

Die Ko-Kulturexperimente bestätigten, dass eine Kultivierung von Endothelzellen und Astrozyten im DynaMiTES möglich ist. Die Permeationskoeffizienten und die TEER-Werte sind vergleichbar mit den Werten der Kontrollzellen und den Permeationsdaten von Eigenmann et al., die bei ihren Permeationsuntersuchungen 24-Well-Zellkultureinsätze von Corning® mit 3 μm Porengröße verwendet haben (Eigenmann

et al. 2013). Allerdings führte die dynamische Ko-Kultivierung gegenüber der statischen Kultivierung zu keiner Verbesserung der Barriereintegrität. Dies korreliert mit den vorherigen Ergebnissen der statischen Ko-Kultivierung (Abschnitt 4.2.2) sowie der dynamischen Mono-Kultivierung (Abschnitt 4.4.2 und 4.4.3).

Erste Versuche zeigten, dass eine Kultivierung der Endothelzellen im DynaMiTES auch direkt nach der Einsaat möglich ist. Die Proliferationsfähigkeit der Endothelzellen scheint im DynaMiTES herabgesetzt zu sein, da die Zellzahl am siebten Tag um mehr als die Hälfte reduziert war. Dieses Ergebnis muss zukünftig durch weitere Versuche reproduziert werden. Für einen besseren Vergleich der Proliferationsraten können Wachstumsanalysen im DynaMiTES und in der 12-Well-Zellkulturplatte durchgeführt werden.

4.5 Kultivierung weiterer Zelllinien im DynaMiTES

Um eine vielseitige Anwendbarkeit des dynamischen Zellkultursystems zu untersuchen, wurden die murine Endothelzelllinie cEND, die humane Epithelzelllinie Caco-2 und die canine Epithelzelllinie MDCK im DynaMiTES kultiviert und der Einfluss auf die Zelleigenschaften untersucht. Nach einer statischen Kultivierung der murinen Endothelzellen im DynaMiTES waren die Barriereintegrität und die Zellkonfluenz unverändert (Tabelle 33). Die Zellen wurden darüber hinaus bei Flussraten von 0,03 bis 3,33 ml/min für 3 h und bei einer Flussrate von 0,03 ml/min für 24 h kultiviert und anschließend analysiert. Analog zu den hCMEC/D3 Zellen (Abschnitt 4.4.2) wurden keine Veränderungen der Zelleigenschaften hinsichtlich der Zellviabilität, der Zellzahl oder der Zellmorphologie ermittelt (Daten nicht gezeigt).

Die Epithelzelllinien Caco-2 und MDCK wiesen nach einer statischen Kultivierung im DynaMiTES eine deutliche Reduktion der TEER-Werte auf (Tabelle 33). Zudem bildeten sich in den MDCK Monolayern teilweise Löcher. Die Zellkonfluenz der Caco-2 Zellen war aufgrund ihres heterogenen Erscheinungsbildes schwerer zu beurteilen, aber auch hier wurden mikroskopisch partielle Ablösungen beobachtet. Ein exemplarischer Versuch mit retinalen Pigment-Epithelzellen (ARPE-19) zeigte, dass eine Kultivierung von Epithelzellen im DynaMiTES generell auch ohne eine Schädigung der Zellmonolayer möglich ist (Daten nicht gezeigt). Allerdings lagen bei diesem Versuch alle TEER-Werte der ARPE-19 Zellen mit $29,0 \pm 1,7 \Omega \cdot \text{cm}^2$ unter ihren herkömmlichen TEER-Werten. Weiterführende Untersuchungen werden in den folgenden Abschnitten mit der Zelllinie MDCK durchgeführt.

Tabelle 33: TEER-Werte nach einer statischen Kultivierung im DynaMiTES für 3 h: cEND (n = 4), Caco-2 (n = 6) und MDCK (n = 15 – 42); die Prozentangaben beziehen sich auf die statische Kultivierung der jeweiligen Zelllinie in den 12-Well-Platten. Die MDCK-Versuche wurden zum Teil mit den Prototypen 1 – 4 durchgeführt. $M \pm SD$

Zelllinien	12-Well-Platte TEER [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]	DynaMiTES TEER [$\Omega \cdot \text{cm}^2$]
cEND	$26,6 \pm 2,8$	$25,2 \pm 2,3$
Caco-2	$932,8 \pm 88,9$	$298,3 \pm 79,6$
MDCK	$4490,4 \pm 1739,2$	$1366,5 \pm 946,3$

4.5.1 Konfluenz der MDCK Zellen

Nach der Kultivierung im DynaMiTES wiesen die MDCK Zellen unabhängig von den Flussbedingungen teilweise kreisrunde Ablösungen und Löcher auf (Abbildung 33). Für eine mikroskopische Untersuchung in Echtzeit wurden einige statische Versuche mit den transparenten unteren DynaMiTES-Ebenen durchgeführt. Diese Versuche bestätigten die Ausbildung von Zellablösungen, die sich mit zunehmender Kultivierungszeit verstärkten. Für diesen Versuchsaufbau wurden die Zellen im DynaMiTES unter dem Mikroskop bei Raumtemperatur ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) kultiviert. Ein möglicher negativer Effekt der Temperatur wurde durch die Kontrollzellen ausgeschlossen.

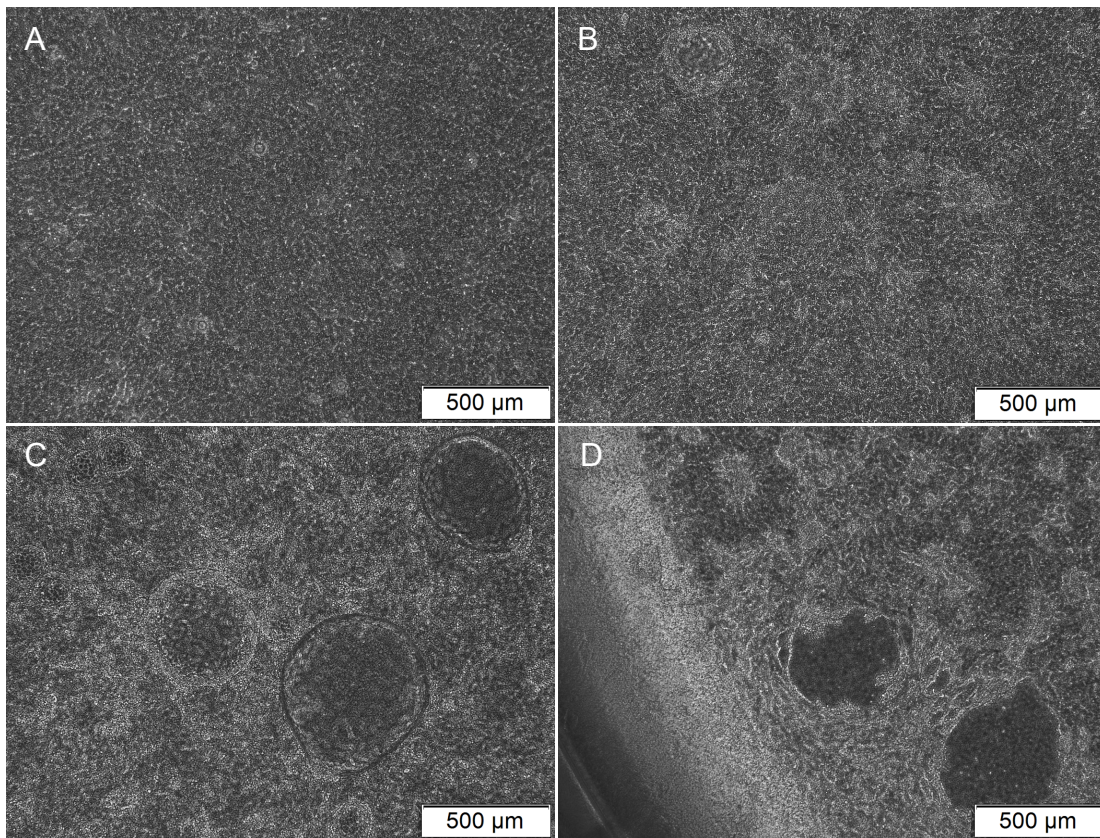


Abbildung 33: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von MDCK Monolayern nach einer statischen Kultivierung im DynaMiTES für 3 h: keine Veränderungen (A), Andeutung kreisrunder Ablösungen (B), deutliche kreisrunde Ablösungen (C) und Lochbildungen im Monolayer (D)

4.5.2 Zell- und Barriereigenschaften der MDCK Zellen

Nach einer Kultivierung im DynaMiTES nahm die Barriereintegrität der Epithelzellen deutlich ab, erkennbar an den niedrigen TEER-Werten und den hohen Permeationskoeffizienten (Tabelle 34). Die hohen Standardabweichungen der TEER-Werte und Permeationskoeffizienten sind durch die unterschiedlich ausgeprägten Ablösungstendenzen im Monolayer zu erklären. Unterschiede abhängig von den untersuchten Flussbedingungen konnten nicht festgestellt werden. Auch eine verlängerte Kultivierungszeit führte zu keiner Regeneration des TEER-Wertes, erkennbar daran, dass die niedrigsten TEER-Werte nach 24 h ermittelt wurden. Die Zellzahlen befanden sich nach einer Kultivierung im DynaMiTES alle in einem Bereich über 80 % bezogen auf die Kontrollzellen. Mit Ausnahme der höchsten Flussrate wurde mit steigender Flussrate eine geringere Zellzahl beobachtet (Tabelle 34).

Tabelle 34: Zell- und Barriereigenschaften der MDCK Zellen nach einer Kultivierung von 3 und 24 h: TEER (n = 8 – 42), P_{app} von Natriumfluoreszein (250 µg/ml; n = 8 – 42), Zellzahl (n = 6 – 44) und Zellmembranintegrität mittels Trypanblaufärbung (n = 4 – 23); die Prozentangaben beziehen sich auf die Kontrollzellen in den 12-Well-Zellkulturplatten. Die 24 h-Versuche wurden mit den DynaMiTES Prototypen 1 – 4 durchgeführt. $M \pm SD$

Kultivierungsbedingung	TEER [%]	P_{app} [$\cdot 10^{-7}$ cm/s]	Zellzahl [%]	Zellmembranintegrität [%]
3 h Kultivierung				
Statisch in 12-Well-Platte	100,0 \pm 7,3	0,37 \pm 0,42	100,0 \pm 9,7	100,0 \pm 1,6
Statisch im DynaMiTES	35,6 \pm 22,4	3,79 \pm 7,73	93,1 \pm 22,9	99,8 \pm 2,6
0,03 ml/min im DynaMiTES	41,3 \pm 22,2	1,28 \pm 1,03	92,4 \pm 14,2	99,9 \pm 0,6
0,33 ml/min im DynaMiTES	30,1 \pm 27,9	3,36 \pm 4,10	90,3 \pm 12,3	101,7 \pm 0,8
0,66 ml/min im DynaMiTES	50,9 \pm 38,7	7,57 \pm 8,68	81,9 \pm 2,6	100,6 \pm 0,9
3,33 ml/min im DynaMiTES	31,1 \pm 23,5	4,62 \pm 6,07	86,8 \pm 20,1	100,2 \pm 1,5
24 h Kultivierung				
Statisch in 12-Well-Platte	100,0 \pm 10,3	0,42 \pm 0,36	100,0 \pm 8,6	100,0 \pm 0,8
Statisch im DynaMiTES	27,5 \pm 21,2	1,63 \pm 2,51	93,0 \pm 21,6	98,9 \pm 0,8
0,03 ml/min im DynaMiTES	9,0 \pm 1,9	0,44 \pm 0,19	97,8 \pm 17,1	98,9 \pm 1,5

4.5.3 TEER-Verlauf der MDCK Zellen im DynaMiTES

Zur weiteren Analyse wurde der TEER-Verlauf der Epithelzellen während der statischen Kultivierung mit Hilfe der DynaMiTES-Elektroden ermittelt. Die Kontrollzellen wurden unter den gleichen Bedingungen in der 12-Well-Zellkulturplatte mit der STX2®-Elektrode vermessen. Nach dem Mediumwechsel und dem Transfer in eine neue 12-Well-Zellkulturplatte stieg der TEER-Wert der Kontrollzellen zunächst leicht an, bevor er sich im Laufe der Kultivierungszeit wieder nivellierte. Der Ausgangswert im DynaMiTES war vergleichbar mit den Werten der Kontrollzellen. Nach wenigen Minuten kam es im DynaMiTES zu einem Abfall der TEER-Werte bis zur Plateaubildung ab Minute 180. Die hohen Standardabweichungen verdeutlichen die Heterogenität der Ergebnisse. Nach dem Herausnehmen aus dem DynaMiTES sank der TEER weiter auf $559 \pm 310 \Omega \cdot \text{cm}^2$ und regenerierte sich nach 20 min auf $937 \pm 667 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Die unbesiedelten Zellkultureinsätze wiesen TEER-Werte von $61 \pm 30 \Omega \cdot \text{cm}^2$ im DynaMiTES auf (Abbildung 34).

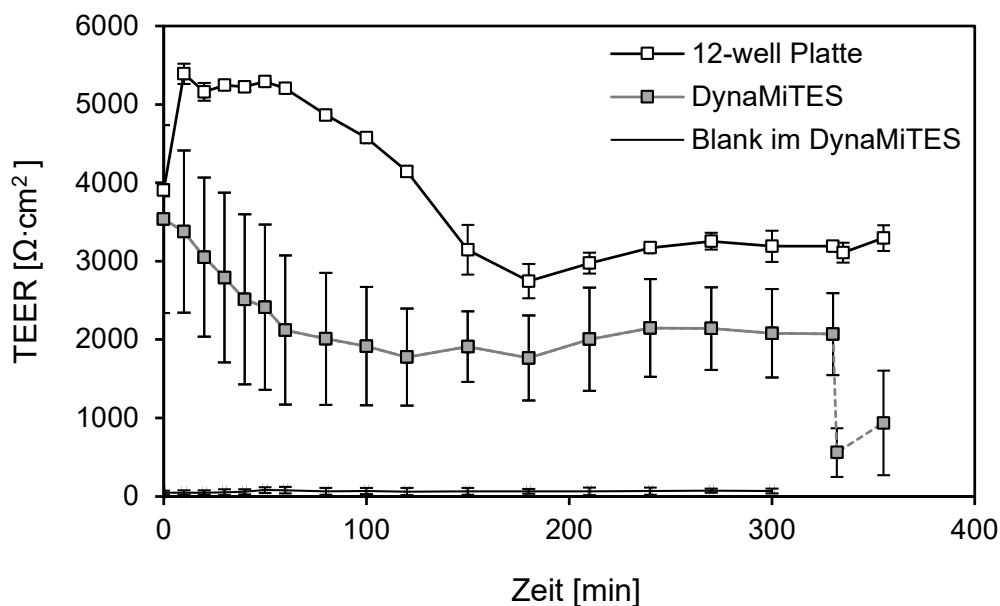


Abbildung 34: TEER-Verlauf von MDCK Zellen nach einer statischen Kultivierung im DynaMiTES im Vergleich zu den Kontrollzellen in der 12-Well-Zellkulturplatte; die gestrichelte Linie repräsentiert die TEER-Werte nach dem Herausnehmen aus dem DynaMiTES gemessen mit der STX2-Elektrode. Zusätzlich wurden die TEER-Werte von unbesiedelten Zellkultureinsätzen (Blank) mit den DynaMiTES-Elektroden ermittelt ($n = 2 - 8$). $M \pm SD$

4.5.4 Zusammenfassende Diskussion zur Kultivierung von weiteren Zelllinien im DynaMiTES

Neben den hCMEC/D3 Zellen wurden drei weitere Zelllinien, die murine Endothelzelllinie sowie die humane und canine Epithelzelllinie, im DynaMiTES kultiviert. Die murine Endothelzelllinie ließ sich analog zur humanen Endothelzelllinie statisch sowie dynamisch im DynaMiTES kultivieren. Anders verhielt es sich bei den Caco-2 und MDCK Zellen. Aufgrund ihrer ausgeprägten Barriereintegrität werden beide Zelllinien häufig in Permeationsstudien eingesetzt und dienen teilweise auch als Surrogat-Modell für die Blut-Hirn-Schranke (Hellinger et al. 2012; Hidalgo 2001). Die Kultivierung dieser Zelllinien im DynaMiTES führte zu einem deutlichen Abfall des TEER-Wertes, der zum Teil mit einer starken Beeinträchtigung des Monolayers in Form von leichten bis starken Ablösungen und Lochbildungen einherging. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt bei den MDCK Zellen, weshalb sie für weiterführende Untersuchungen verwendet wurden.

Die Veränderungen der MDCK Monolayer traten unabhängig von den Flussbedingungen innerhalb von 3 h auf. Der Integritätsverlust wurde durch eine Senkung des TEER-Wertes und eine Steigerung des Permeationskoeffizienten deutlich. Auch bei mikroskopisch scheinbar unveränderten Monolayern wurde teilweise eine Reduktion des TEER-Wertes ermittelt. Waren keine mikroskopischen Veränderungen oder nur leichte Ablösungstendenzen zu erkennen, kam es im Anschluss unter einer herkömmlichen Kultivierung häufig zu einer Regeneration des TEER-Wertes. Des Weiteren verdeutlichte die mikroskopische Untersuchung über den gesamten Kultivierungszeitraum, dass die Monolayer direkt nach dem Einsetzen ins DynaMiTES noch intakt waren, jedoch kurze Zeit später (noch vor dem Herausnehmen) Veränderungen auftraten. Eine konkrete Ursache für die aufgetretene Ablösungstendenz der MDCK Zellen ließ sich nicht ermitteln. Es zeigte sich, dass die verschiedenen Zelllinien auf eine Kultivierung im DynaMiTES unterschiedlich reagierten. Bei den untersuchten Zelllinien zeigten die Zellen mit geringeren TEER-Werten ($\leq 30 \Omega \cdot \text{cm}^2$) eine gute Verträglichkeit, wohingegen die Zellen mit höheren initialen TEER-Werten ($\geq 900 \Omega \cdot \text{cm}^2$) einem ausgeprägten Integritätsverlust unterlagen. Die Kultivierungen von weiteren barriereformenden Zelllinien mit unterschiedlichen TEER-Werten ist erforderlich, um weitergehende Aussagen treffen zu können.

4.6 Einflussfaktoren des DynaMiTES auf die Barriereintegrität von MDCK Zellen

Zur Charakterisierung verschiedener Einflussfaktoren des DynaMiTES auf die Zellbarriere wurde die MDCK Zelllinie verwendet. Es wurden Kultivierungsbedingungen, Druck- und Luftverhältnisse, mechanische Belastungssituationen, die Elektroden sowie der DynaMiTES-Aufbau und die Dichtungsringe untersucht. Um festzustellen, inwiefern das Zellkulturmedium die TEER-Werte der Epithelzellen beeinflusst, wurden die Zellen sowohl im MDCK-Medium unter 5 % CO₂-Zufuhr im DynaMiTES als auch im CO₂-unabhängigen Puffer KRB und in CO₂-IDM jeweils unter atmosphärischen Bedingungen statisch für 3,5 h kultiviert. Es stellte sich heraus, dass die Zellen unabhängig von den Kultivierungsvariationen nach der DynaMiTES-Kultivierung einem TEER-senkenden Effekt unterlagen (Tabelle 35). Als nächstes wurde sichergestellt, dass dieser Effekt nicht durch schädliche Verbindungen in den Medien ausgelöst wurde. So wurde das MDCK-Medium einmal in Anwesenheit und einmal in Abwesenheit der Zellen für jeweils 3 h im DynaMiTES inkubiert. In Analogie zu den Ergebnissen in Tabelle 34 sank der TEER-Wert der MDCK Zellen deutlich ab. Beide Medienproben wurde anschließend zur Weiterkultivierung neuer MDCK Zellen in einer 12-Well-Zellkulturplatte verwendet und der TEER-Wert analysiert. Da weder nach 2 h (Tabelle 35) noch nach 24 h (Daten nicht gezeigt) Veränderungen des TEER-Wertes oder des Monolayers auftraten, ist ein negativer Einfluss auf die Barriere durch Herauslösungen ins Medium unwahrscheinlich.

Während der statischen Kultivierung im DynaMiTES bildeten sich im Donor-Kompartiment teilweise kleine Luftblasen am Rand des Kanals. Diese wurden möglicherweise durch die gaspermeablen PTFE-Schläuche sowie die Undichtigkeiten des Systems herbeigeführt. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von Luft auf die Barriereigenschaften der Zellen untersucht. Die Epithelzellen wurden hierfür für 3 h sowie für 48 h ohne Medium im Donor in einer 12-Well-Zellkulturplatte kultiviert. Nach 3 h war eine intakte Barriere mit TEER-Werten über 85 % erkennbar. Nach 48 h zeigte sich eine deutliche Reduzierung des TEER-Wertes auf unter 50 %, der sich nach einer weiteren Kultivierung von 4 h unter herkömmlicher Versorgung wieder vollständig regenerierte. Mikroskopisch gesehen blieben alle Monolayer unversehrt. Die Untersuchungen belegen, dass ein kurzzeitiger Luftkontakt von 3 h keinen

Einfluss auf die Barriereigenschaften hat. Auch ein Einfluss unterschiedlicher Füllstände und Druckverhältnisse im DynaMiTES wurde untersucht, indem die Zellen einmal ohne Medium im Donor-Kompartiment und einmal ohne Medium im Akzeptor-Kompartiment statisch kultiviert wurden. Beide Varianten führten zu einer vergleichbaren TEER-Senkung. Ebenso zeigte eine vollständige Füllung beider Kompartimente bei gleichzeitiger Kultivierung des DynaMiTES auf der oberen Ebene, also 180° um die horizontale Achse gedreht, keinen Unterschied gegenüber den herkömmlichen Kultivierungsbedingungen (Tabelle 35).

Tabelle 35: Einflussfaktoren auf die Barriereintegrität von MDCK: unterschiedliche Kultivierungsmedien (n = 3), Herauslösungen ins Medium (n = 3), Luftkontakt (n = 3 – 10), Füllstände (n = 2 – 3), Kultivierungsausrichtung (n = 14 – 18) und Kanalhöhe (n = 2 – 4); sofern nicht anders vermerkt wurde das MDCK-Medium verwendet. Die Prozentangaben beziehen sich auf die jeweiligen Kontrollzellen in den 12-Well-Zellkulturplatten. Fett gedruckte Zahlen markieren TEER-Werte unter 80 %. *M ± SD*

Einflussfaktoren	TEER [%] Kontrolle	TEER [%] DynaMiTES
Medium		
DynaMiTES 3,5 h in CO ₂ -IDM	100,0 ± 3,5	51,8 ± 23,9
DynaMiTES 3,5 h in MDCK-Medium	100,0 ± 6,3	43,6 ± 24,7
DynaMiTES 3,5 h in KRB	100,0 ± 2,2	21,9 ± 4,3
Herauslösungen nach 3 h		
DynaMiTES Blank-Medium in 12-Well-Platte	100,0 ± 13,3	102,3 ± 5,0
DynaMiTES Zell-Medium in 12-Well-Platte	100,0 ± 6,7	104,1 ± 10,5
Luftkontakt und Füllstände		
12-Well-Platte ohne Donor 3 h	100,0 ± 10,6	87,5 ± 19,6
12-Well-Platte ohne Donor 48 h	100,0 ± 18,2	46,0 ± 6,0
DynaMiTES ohne Donor 3 h	100,0 ± 3,5	50,7 ± 22,5
DynaMiTES ohne Akzeptor 3 h	100,0 ± 3,5	39,0 ± 2,6
DynaMiTES um 180° gedreht 3 h	100,0 ± 1,9	45,7 ± 34,2
Kultivierungsausrichtung		
DynaMiTES invers 3 h	100,0 ± 6,0	27,6 ± 27,1
DynaMiTES normal 3 h	100,0 ± 6,6	41,9 ± 35,6
Kanalhöhe		
DynaMiTES invers 3 h mit 1 mm dicker Dichtungsfolie (statt 0,5 mm)	100,0 ± 11,5	29,4 ± 21,9

Zur Untersuchung der Kultivierungsausrichtung wurden die Zellen normal und invers eingesät, vorkultiviert und anschließend für 3 h statisch im DynaMiTES kultiviert. Die Epithelzellen zeigten in der normalen und in der inversen Kultivierungsausrichtung einen TEER-senkenden Effekt mit hohen Standardabweichungen, wobei die normal kultivierten Zellen leicht höhere TEER-Werte aufwiesen. Zusätzlich wurde durch die Verwendung einer dickeren Dichtungsfolie zwischen der mittleren und unteren Ebene der Abstand zwischen den Zellen und dem Kanalboden erhöht und somit eine größere Kanalhöhe imitiert. Der größere Zell-Kanal-Abstand wirkte sich allerdings nicht auf den TEER-Wert der Zellen aus (Tabelle 35).

Tabelle 36: Einflussfaktoren auf die Barriereintegrität von MDCK: Einsetzen ins DynaMiTES und Herausnehmen (n = 6 – 10), 20-maliges Hoch- und Heruntersetzen in die 12-Well-Zellkulturplatte (n = 4), Drücken (n = 3) und Fallenlassen des Zellkultureinsatzes (n = 3 – 8); als Kontrolle diente der TEER-Wert, der unmittelbar vor der mechanischen Belastung in der 12-Well-Zellkulturplatte ermittelt wurde, und die Regenerationszeit betrug 5 min. Fett gedruckte Zahlen markieren TEER-Werte unter 80 %. $M \pm SD$; (i) = invers eingesät; (n) = normal eingesät

Einflussfaktoren	TEER [%]		
	vorher	nachher	Regeneration
Einsetzen und Herausnehmen			
1x in 12-Well-Platte	100,0 \pm 10,2	91,8 \pm 18,0	98,5 \pm 12,3
1x in DynaMiTES	100,0 \pm 13,0	81,3 \pm 24,1	102,5 \pm 31,5
3x in DynaMiTES	100,0 \pm 11,3	54,4 \pm 22,6	77,2 \pm 22,4
6x in DynaMiTES	100,0 \pm 8,0	37,3 \pm 22,5	45,3 \pm 24,7
Mechanische Belastung			
Zellkultureinsatz (i) 20x in 12-Well-Platte	100,0 \pm 1,3	83,3 \pm 16,4	84,9 \pm 17,9
Zellkultureinsatz (i) gedrückt	100,0 \pm 15,5	101,3 \pm 25,1	101,3 \pm 36,5
Zellkultureinsatz (i) auf Seite gefallen	100,0 \pm 2,1	83,6 \pm 25,0	97,1 \pm 12,4
Zellkultureinsatz (i) auf Membran gefallen	100,0 \pm 6,4	45,6 \pm 23,9	62,7 \pm 36,0
Zellkultureinsatz (n) auf Membran gefallen	100,0 \pm 6,1	100,1 \pm 1,7	105,4 \pm 2,4

Für die Kultivierungsversuche im DynaMiTES (Abschnitt 4.5) wurden die Zellen üblicherweise einmal eingesetzt und wieder herausgenommen, wobei ein Zeitabstand von mehreren Stunden zwischen diesen beiden Prozessen lag. Dieses Umsetzen der Zellen könnte ein möglicher Stressfaktor für sie sein und Einfluss auf ihre Barriere-eigenschaften nehmen. Die Tabelle 36 zeigt, dass das einmalige Einsetzen und Herausnehmen aus dem DynaMiTES zu einer leichten Reduzierung des TEER-Wertes

führte, der sich innerhalb von 5 min vollständig regenerierte. Je häufiger ein Zellkultureinsatz hintereinander eingesetzt und wieder herausgenommen wurde, desto größer war die TEER-Senkung und geringer die TEER-Regeneration. Als Vergleich dienten Kontrollzellen in einer 12-Well-Zellkulturplatte, die einmalig in eine neue 12-Well-Zellkulturplatte überführt wurden.

Um außerdem mögliche Druckeffekte auf die Epithelzellen nachzuempfinden, wurden verschiedene mechanische Belastungen auf den Zellkultureinsatz ausgeübt. Bei den verschiedenen Belastungssituationen bewirkte nur ein direkter Fall auf den Zellrasen eine TEER-Senkung unter 50 % (Tabelle 36). Mikroskopisch wurde hingegen keine Veränderung der Zellmonolayer beobachtet. Möglicherweise war die Dauer der verschiedenen Belastungen (z. B. das einmalige Drücken des Zellkultureinsatzes) zu kurz, um einen Effekt auf die Zellen feststellen zu können.

4.6.1 Variationen der DynaMiTES-Kultivierung unter Beteiligung einzelner Ebenen

Um den Einfluss der einzelnen DynaMiTES-Ebenen auf den TEER-Abfall zu untersuchen, wurden die Epithelzellen in der mittleren Ebene unter verschiedenen Konstellationen kultiviert: ohne die obere und untere Ebene (Abbildung 35, A), ohne die untere Ebene (Abbildung 35, B) und ohne die obere Ebene (nicht dargestellt).

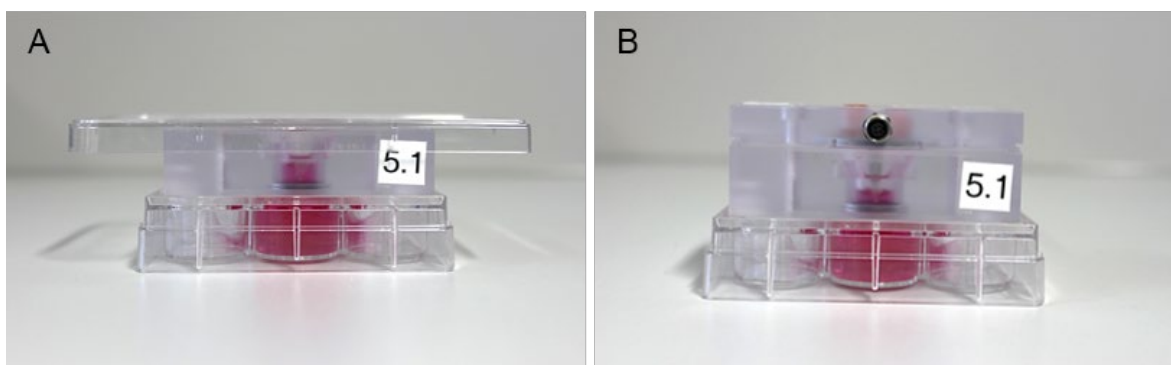


Abbildung 35: Kultivierungsvariationen A) ohne die untere Ebene und B) ohne die obere und untere Ebene

Diese Variationen wurden mit einer Kultivierung in der 12-Well-Zellkulturplatte und im vollständig zusammengebauten DynaMiTES verglichen. Die Untersuchungen ergaben, dass eine Zellkultivierung im DynaMiTES unter Verwendung der mittleren

und unteren Ebene einen vergleichbaren TEER-senkenden Effekt verursacht wie das vollständig zusammengebaute DynaMiTES. Ohne die Beteiligung der unteren Ebene (also bei einer Kultivierung ausschließlich in der mittleren Ebene oder in der mittleren und oberen Ebene) war die TEER-Wertsenkung geringer ausgeprägt. Wurde der Zellkultureinsatz in das DynaMiTES nur halb und ohne die Überwindung des größten Widerstands eingesetzt, lag der TEER-Wert auch nach 3 h in einem Bereich über 85 %. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die TEER-Senkung durch das untere Drittel der mittleren Ebene hervorgerufen und durch die Anwesenheit der unteren Ebene verstärkt wird (Abbildung 36).

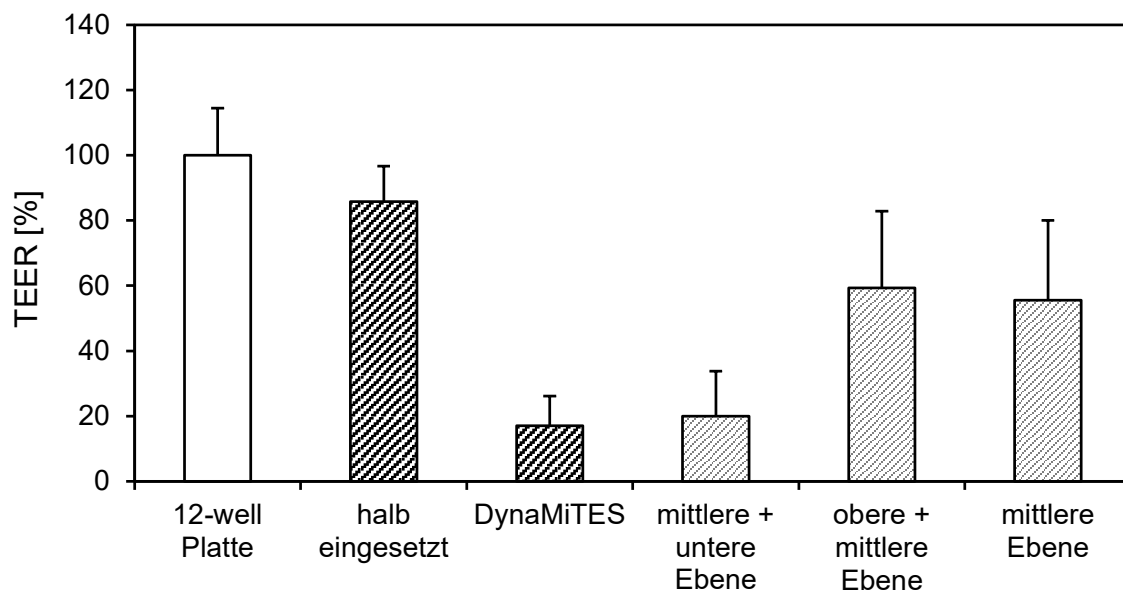


Abbildung 36: TEER-Werte von MDCK Zellen nach einer Kultivierung unter verschiedenen Bedingungen: Zellkultureinsatz halb ins DynaMiTES eingesetzt ($n = 3$), vollständig ins DynaMiTES eingeführt ($n = 12$) und in verschiedenen Kombinationen der Ebenen ($n = 8 - 10$) eingesetzt; die Werte sind in Prozent dargestellt und beziehen sich auf die Kontrollzellen in der 12-Well-Platte ($n = 13$). $M \pm SD$

In einem weiteren Versuch wurden die Zellen erst auf die PET-Membran ausgesät, nachdem der Zellkultureinsatz schon in der mittleren Ebene eingesetzt war. Die Endothelzellen wurden für vier Tage in der mittleren Ebene kultiviert. Anschließend wurden sie entweder herausgenommen und analysiert oder in der mittleren Ebene belassen. Im letzteren Fall wurde die mittlere Ebene mit Hilfe der anderen beiden Ebenen zum DynaMiTES zusammengebaut und der kurzzeitige bzw. 3-stündige Einfluss des vollständig zusammengebauten DynaMiTES untersucht (Abschnitt 3.2.8.3). Auch bei diesem Versuchsaufbau zeigte die Kultivierung in der mittleren DynaMiTES-Ebene eine TEER-Wertreduktion auf ca. 60 % (Tabelle 37).

Das bedeutet, dass auch ohne die Durchführung des Einsetzprozesses die Barriereintegrität der Zellen deutlich geschwächt wird. Außerdem lässt sich durch die Abwesenheit der oberen und unteren Ebene ein negativer Einfluss der Elektroden ausschließen. Der folgende Zusammenbau der mit Zellen vorkultivierten mittleren Ebene zum DynaMiTES führte nach 3 h zu einer zusätzlichen TEER-Senkung, wohingegen das kurzzeitige Zusammenbauen zum DynaMiTES keinen weiteren Effekt ausübte (Tabelle 37).

Tabelle 37: TEER-Werte von MDCK Zellen nach verschiedenen Kultivierungsvariationen; die Zellen wurden für 4 d in der mittleren Ebene kultiviert und entweder herausgenommen (4 d in mittlere Ebene, $n = 4$) oder in der mittleren Ebene belassen und zum DynaMiTES zusammengebaut. Die Zellkultureinsätze im DynaMiTES wurden entweder direkt wieder herausgenommen (4 d in mittlere Ebene, zusammengebaut zum DynaMiTES; $n = 7$) oder für weitere 3 h im DynaMiTES kultiviert (4 d in mittlere Ebene, zusammengebaut zum DynaMiTES, 3 h kultiviert; $n = 5$). Die Prozentangaben beziehen sich auf die Kontrollzellen in den 12-Well-Zellkulturplatten ($n = 13$). $M \pm SD$

Kultivierungsvariationen	TEER [%]
4 d in 12-Well-Platte	100,0 \pm 21,9
4 d in 12-Well-Platte, 3 h in neuer 12-Well-Platte	100,0 \pm 20,7
4 d in mittlerer Ebene	59,1 \pm 35,4
4 d in mittlerer Ebene, zum DynaMiTES zusammengebaut	61,1 \pm 48,4
4 d in mittlerer Ebene, zum DynaMiTES zusammengebaut, 3 h kultiviert	16,7 \pm 9,7

Beim Einsetzen von unbesiedelten Zellkultureinsätzen ins DynaMiTES wurde in einigen Fällen eine leichte Wellenbildung der Membran beobachtet (Anhang 9.3). Die Zellkultureinsätze verhielten sich recht heterogen und die Wellenbildung trat nur gelegentlich auf. Die Heterogenität lässt sich zum einen durch die Zellkultureinsätze zum anderen durch die Dichtungsringe erklären. Die Zellkultureinsätze waren leicht konisch geformt und wiesen eine gewisse Toleranz hinsichtlich der Außendurchmesser und der Form auf. Außerdem variierte der Widerstand der Dichtungsringe in Abhängigkeit der Benutzungsdauer. Insgesamt konnte kein systematischer Zusammenhang zwischen der TEER-Senkung und dem Widerstand beim Einsetzen sowie der Wellenbildung beobachtet werden. Außerdem konnte mit einem optischen Messverfahren durch das Abtasten der Oberfläche mit einem Laser keine Veränderung der Membran festgestellt werden.

4.6.2 Einfluss des Dichtungsringes

Der Dichtungsring in der mittleren Ebene stellte den größten Widerstand beim Einsetzen des Zellkultureinsatzes dar. Er kompensierte mögliche Variationen der Außenform des Zellkultureinsatzes und dichtete Akzeptor- und Donor-Kompartiment voneinander ab. Im vorherigen Abschnitt wurde ausgeführt, dass das untere Drittel der mittleren Ebene einen Einfluss auf die Barriereigenschaften der Zellen hat. Aus diesem Grund wird im Folgenden der Einfluss des Dichtungsringes erläutert.

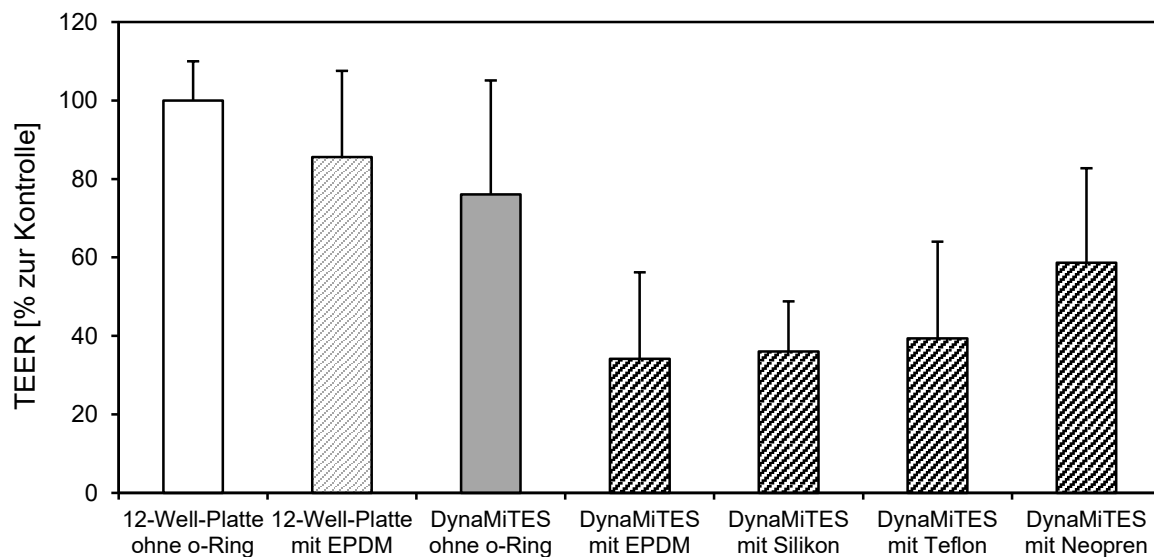


Abbildung 37: TEER-Werte von MDCK Zellen nach einer statischen Kultivierung von 3 h: DynaMiTES ohne Dichtungsring (n = 10) und mit Dichtungsringen aus EPDM (n = 37), Silikon (n = 7), Teflon (n = 3) und Neopren (n = 16), 12-Well-Zellkulturplatte ohne (100 %-Kontrolle, n = 42) und mit EPDM-Dichtungsring (n = 5); $M \pm SD$

Bei den DynaMiTES-Versuchen wurde üblicherweise ein Dichtungsring aus EPDM (70 Shore) mit einer guten Zellverträglichkeit verwendet (Abschnitt 4.3). Um den Einfluss des Dichtungsringes zu untersuchen, wurden die Epithelzellen im DynaMiTES und in einer 12-Well-Zellkulturplatte jeweils mit und ohne den Dichtungsring kultiviert (Abbildung 37). Die TEER-Werte im DynaMiTES lagen ohne Dichtungsring in einem Bereich von 76 %. Wurden die MDCK Zellen hingegen wie üblich im DynaMiTES mit Dichtungsring kultiviert, sank der TEER-Wert. Das belegt, dass der Dichtungsring einen Effekt auf die Barriere ausübt. Wurde hingegen der Zellkultureinsatz in den EPDM-Dichtungsring eingesetzt und in der 12-Well-Zellkulturplatte kultiviert, kam es zu einer geringen TEER-Reduktion. Im Unterschied zum DynaMiTES konnte in der 12-Well-Zellkulturplatte der Dichtungsring nach außen hin expandieren und war nicht durch das Vorhandensein einer Nut eingeschränkt.

Bei der Verwendung von Silikon-Dichtungsringen mit einer Shore-Härte von 30 bzw. Teflon-Dichtungsringen mit einer glatten Oberfläche und einer Shore-Härte von 50, kam es zu einem vergleichbaren Abfall der TEER-Werte im DynaMiTES wie mit den EPDM-Dichtungsringen. Bei dem Einsatz von Neopren-Dichtungsringen (30 Shore) wiesen die Zellen leicht höhere TEER-Werte auf. Wahrscheinlich ist dieser Effekt auf das geschäumte Material und die damit verbundene höhere Flexibilität zurückzuführen. Allerdings traten bei den Neopren-Dichtungsringen Undichtigkeiten zwischen den Kompartimenten vermehrt auf, so dass sie keine angemessene Alternative darstellen.

4.6.3 Zusammenfassende Diskussion der Einflussfaktoren des DynaMiTES auf die Barriereintegrität von MDCK Zellen

Die Untersuchungen verschiedener Einflussfaktoren im DynaMiTES haben ergeben, dass die TEER-Senkung multifaktoriell bedingt ist. Hierbei spielen das Zellkulturmedium, Herauslösungen ins Medium, die Elektroden, die Kanalhöhe und die Füllstände eine untergeordnete Rolle. Außerdem beeinflusst ein kurzfristiger Luftkontakt von 3 h die TEER-Werte nur marginal. Wie im Abschnitt 4.4.4 diskutiert, war es bei dem gewählten Versuchsaufbau nicht möglich, die dynamischen Luft-Flüssigkeits-Grenzflächen zu imitieren, weshalb ein negativer Einfluss von Luftblasen nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann.

Der Einsetzprozess des Zellkultureinsatzes ins DynaMiTES und das anschließende Herausnehmen beeinflussen den TEER-Wert der Epithelzellen und stellen kurzzeitig eine Störung der physiologischen Bedingungen dar. Je häufiger dieser Prozess hintereinander durchgeführt wurde, desto größer war der Einfluss auf die Barriereigenschaften. Ein einmaliges Einsetzen, wie es bei den Kultivierungsversuchen im DynaMiTES üblich war, wurde hingegen von den Epithelzellen gut vertragen.

Der MDCK Monolayer unterlag in der normalen und inversen Zellorientierung im DynaMiTES einer TEER-Senkung. Somit kann der negative Einfluss auf die Barriere keiner Kultivierungsseite und somit auch keinem DynaMiTES-Kompartiment zugeordnet werden. Es war allerdings auch zu beobachten, dass die Zellen in normaler Kultivierungsausrichtung leicht höhere TEER-Werte generierten.

Die Kultivierung unter Beteiligung einzelner DynaMiTES-Ebenen hat ergeben, dass der TEER-senkende Effekt seinen Ursprung im unteren Drittel der mittleren Ebene haben muss. In Anwesenheit der unteren Ebene wurde dieser Effekt noch einmal deutlich verstärkt. Der Dichtungsring stellt in der mittleren Ebene die Stelle mit dem größten Widerstand beim Einsetzen des Zellkultureinsatzes dar. Möglicherweise übt der Dichtungsring einen Druck auf den Zellkultureinsatz aus, der sich über die Membran negativ auf die Zellen auswirkt. Veränderte Dichtringmaterialien mit unterschiedlichen Shore-Härten zeigten bei einer gleichzeitig guten Abdichtung keinen Erfolg.

Allgemein waren bei den meisten Versuchen die Ergebnisse durch eine große Standardabweichung und Heterogenität geprägt. Diese Variationsbreiten sind durch Fertigungsabweichungen der Zellkultureinsätze, des DynaMiTES-Grundkörpers und des Dichtungsringes zu erklären.

5 Abschlussdiskussion

Die Blut-Hirn-Schranke-Schranke ist eine restriktive Barriere zwischen dem ZNS und dem Blutkreislauf, die essenziell für die neuronale Homöostase ist und den Organismus vor schädlichen Substanzen schützt (Abbott 2013). In der Arzneimittelentwicklung stellt sie eine große Herausforderung dar, da fast alle größeren Moleküle und mehr als 98 % der kleineren Moleküle gehindert werden das ZNS zu erreichen (Pardridge 2003). Um einen Misserfolg potenzieller Wirkstoffe bereits in der frühen Entwicklungsphase aufdecken zu können, sind zuverlässige *in vitro*-Testsysteme erforderlich. Um speziesspezifische Unterschiede zu umgehen, wird die Anwendung einer humanen Endothelzelllinie als sinnvoll erachtet (Warren et al. 2009). Durch die geringe Verfügbarkeit humanen Ausgangsmaterials sind bisher nur wenige humane immortalisierte Zelllinien beschrieben (Rahman et al. 2016; Eigenmann et al. 2013). Unter ihnen ist die zerebrale mikrovaskuläre Endothelzelllinie hCMEC/D3 am weitesten verbreitet (Rahman et al. 2016). Es handelt sich um eine gut charakterisierte Zelllinie, bei der bereits die Expression von relevanten Zell-Zell-Kontaktproteinen, Transportproteinen und verschiedenen Endothelmarkern beschrieben wurde (Weksler et al. 2013).

1. Ist die funktionelle Barriereintegrität der hCMEC/D3 Zelllinie in der vorliegenden Untersuchung vergleichbar mit den Literaturangaben?

In der Literatur wird die humane Endothelzelllinie unter den herkömmlichen Kultivierungsbedingungen häufig mit moderat restriktiven Barriereigenschaften beschrieben. Die angegebenen TEER-Werte variieren von 30 bis 60 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (Urich et al. 2012; Hatherell et al. 2011; Ragnai et al. 2011; Vu et al. 2009; Förster et al. 2008; Weksler et al. 2005) sowie teilweise bis 100 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (Chen et al. 2015; Liu et al. 2014; Daniels et al. 2013). Diese Werte konnten in der vorliegenden Arbeit nicht reproduziert werden. In der Langzeitstudie über 27 Tage befand sich der TEER in einem Bereich unter 20 $\Omega \cdot \text{cm}^2$. Dieses Ergebnis ist jedoch in Übereinstimmung mit denen weiterer Studien, die ebenfalls TEER-Werte in einem vergleichbar niedrigen Bereich erzielten (Biemans et al. 2017; Al-Shehri et al. 2015; Eigenmann et al. 2013; Schrade et al. 2012).

Die unterschiedlichen TEER-Angaben lassen sich durch methodische Heterogenität hinsichtlich der Kultivierungsbedingungen, der Zellkultursysteme, der Handhabung, der Messtemperatur und der Messgeräte erklären (Sheller et al. 2017; Czupalla et al. 2014). Ein weiterer Grund könnte sein, dass sich die Zelleigenschaften der Endothelzelllinie im Laufe der Kultivierungszeit verändert haben und die Endothelzellen verstärkt dedifferenziert sind (Hughes et al. 2007). Solch ein Phänomen wurde bei der hCMEC/D3 Zelllinie von Schrade et al. beobachtet. Sie stellten fest, dass die Endothelzellen in frühen Passagen TEER-Werte von 35 bis 40 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ erreichten, die bei einer Kultivierung über die Passage 31 hinaus auf 20 bis 22 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ absanken. Als Erklärung wurde eine verringerte Expression von Claudin-3 angegeben (Schrade et al. 2012). Darüber hinaus zeigte eine molekulare zytogenetische Charakterisierung der hCMEC/D3 Zellen in Passage 30 eine komplexe chromosomale Umlagerung, was auf eine Instabilität der Zelllinie schließen lässt (Mkrtchyan et al. 2009). In der Literatur wird die Endothelzelllinie meist in einer Passage von 25 bis 35 (Rahman et al. 2016; Mkrtchyan et al. 2009) teilweise auch bis zur Passage 40 (Hatherell et al. 2011; Chen et al. 2015) verwendet. Auch andere zerebrale Endothelzelllinien zeigten einen Zusammenhang zwischen der Barriereintegrität und der Passagenanzahl. So stellten Brown et al. einen signifikanten Anstieg der Permeabilität durch einen bEND3 Monolayer bei einer Passage von 35 im Vergleich zu 25 fest. Bei der Genexpressionsanalyse konnten hingegen keine Unterschiede zwischen den Passagen hinsichtlich relevanter TJ-Proteine festgestellt werden (Brown et al. 2007). Für die vorliegenden Untersuchungen wurde die hCMEC/D3 Zelllinie in Passage 26 bezogen und bis Passage 35 – vergleichbar mit den Literaturdaten – und teilweise bis zur Passage 40 für Zellviabilitätsuntersuchungen eingesetzt. Ein Unterschied der TEER-Werte innerhalb der einzelnen Passagen wurde nicht beobachtet. Die Angabe der Passagenanzahl ist allerdings aufgrund von leicht abweichenden Kultivierungsroutinen unpräzise und eine Angabe zur Anzahl der Populationsverdopplungen wäre für einen direkten Vergleich aussagekräftiger.

Des Weiteren wurde in der immunzytochemischen Untersuchung eine unvollständige Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte festgestellt. Die TJ-Proteine Occludin, ZO-1 und Claudin-5 waren größtenteils zytosolisch lokalisiert und, mit Ausnahme von Occludin, sehr schwach ausgeprägt. Vergleichbar unvollständige Formationen bzw. schwache

Ausprägungen wurden bei ZO-1 (Walter et al. 2016) und Claudin-5 beobachtet (Veszeka et al. 2018; Biemans et al. 2017). Demgegenüber stellten andere Studien eine größtenteils kontinuierlich intramembranöse Immunfluoreszenzfärbung ausgewählter TJ-Proteine dar (Sreekanthreddy et al. 2015; Sajja et al. 2014; Weksler et al. 2005). Die Unterschiede in der Proteinexpression zwischen den Studien weisen erneut auf die Heterogenität der Zelllinie hin und könnten auch eine Erklärung für die variierenden veröffentlichten TEER-Ergebnisse sein.

2. Welchen Einfluss haben verschiedene statische Kultivierungsvariationen auf die Eigenschaften der hCMEC/D3 Zelllinie?

Die Charakterisierung der hCMEC/D3 Zelllinie hat gezeigt, dass weitere Optimierungen notwendig sind, um die Barrieredichtigkeit der Zellen zu verbessern. Daher wurde in der vorliegenden parametrischen Untersuchung der Einfluss von Zellkulturmedien, Medienzusätzen, Beschichtungsmaterialien, Membraneigenschaften und Ko-Kultivierungsvarianten auf die Zell- und Barriereeigenschaften der hCMEC/D3 Zelllinie ermittelt. Die Untersuchung verschiedener Zellkulturmedien hat ergeben, dass die Wachstumseigenschaften der Endothelzelllinie in ECGM MV-2, MCDB 131 und in dem serumfreien Medium hESFM vergleichbar mit dem Standardmedium EGM-2 waren. In der Literatur wird die Endothelzelllinie überwiegend in dem Medium EGM-2 (Eigenmann et al. 2013; Urich et al. 2012; Poller et al. 2008; Weksler et al. 2005), vereinzelt auch in MCDB 131 (Veszeka et al. 2018; Walter et al. 2016) kultiviert. Keines der getesteten Zellkulturmedien verbesserte die Wachstumsrate oder die Barrierewirksamkeit der Endothelzelllinie erheblich. Dennoch ermöglicht die serumfreie Kultivierung eine bessere Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Forschungsgruppen (Baker 2016; van der Valk et al. 2010). Daher könnte hESFM als Alternative zu EGM-2 in Betracht gezogen werden. Zukünftig sind weitere Untersuchungen erforderlich, um die Auswirkungen einer Langzeitkultivierung und den Einfluss auf die Ausbildung spezifischer Merkmale wie Stoffwechselenzyme und Transportproteine zu ermitteln.

Des Weiteren hat sich ergeben, dass die Beschichtungsvariationen aus Kollagen I bzw. IV, Fibronectin und Laminin sowie die Medienzusätze Serum, Hydrocortison, Calcium und pCPT-cAMP kombiniert mit Ro-20-1724 zu keiner Verbesserung der Barriere-

eigenschaften geführt haben. Eine signifikante Steigerung des TEER-Wertes konnte allerdings durch die direkte Ko-Kultivierung mit immortalisierten humanen Astrozyten erzielt werden. In der Literatur wird die optimale Ko-Kultivierungsvariante kontrovers diskutiert. Während viele Studien den höchsten TEER-Wert bei der direkten Ko-Kultivierung von Endothelzellen und Astrozyten ermittelt haben (Kuo und Lu 2011; Kröll et al. 2009; Gaillard et al. 2001), zeigten einige Studien einen größeren Effekt bei dem indirekten Modell (Wilhelm und Krizbai 2014; Wuest et al. 2013; Shayan et al. 2011). Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich durch die Membranauswahl begründen, da die Membrandicke, Porendichte und Porengröße ausschlaggebend für den interzellulären Kontakt sind (Shayan et al. 2011; Ma et al. 2005; Demeuse et al. 2002). Hinzu kommt, dass das Ursprungsgewebe, die Zelltypen und die Zellkombinationen wichtige Einflussfaktoren sind. So wurde beispielsweise beschrieben, dass porcine Perizyten in einer direkten Ko-Kultur die Expression von Claudin-5 erhöhen, wohingegen murine Perizyten in einer indirekten Ko-Kultur mit den porcinen BCECs zu einer gesteigerten P-gp- und Occludin-Expression führten. (Thomsen et al. 2015). Hatherell et al. untersuchten den Einfluss verschiedener Kultivierungsvarianten auf die hCMEC/D3 Zellen. Sie erzielten in ihrer Untersuchung eine signifikante TEER-Erhöhung auf den Wert von $60 \pm 1,0 \Omega \cdot \text{cm}^2$ bei einer direkten Ko-Kultivierung mit humanen primären Astrozyten aus dem Gehirn. Interessanterweise führte die Triple-Kultur mit zusätzlichen primären zerebralen Perizyten zu keiner TEER-Steigerung.

In der vorliegenden Arbeit wurde der TEER-Anstieg des direkten Ko-Kulturmodells allein auf den Widerstand eines zusätzlichen Zellmonolayers zurückgeführt und ein restriktiver Effekt der humanen immortalisierten Astrozyten auf die endotheliale Barriereintegrität ausgeschlossen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Untersuchungsergebnissen von Eigenmann et al. und Cucullo et al., die bei der Ko-Kultivierung von hCMEC/D3 Zellen mit humanen immortalisierten Astrozyten bzw. humanen primären Astrozyten ebenfalls keinen Einfluss auf die Barriereigenschaften beobachteten (Eigenmann et al. 2013; Cucullo et al. 2008). Die widersprüchlichen Ergebnisse zu Hatherell et al. könnten durch unterschiedliche Zelltypen und Kultivierungsbedingungen bedingt sein. Zudem kann bei einer Verwendung von Membranen mit $3 \mu\text{m}$ Porengrößen, wie bei Hatherell et al., die

Bildung eines Multilayers nicht ausgeschlossen werden (Ye et al. 2015; Wuest et al. 2013; Demeuse et al. 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Untersuchung keine der integritäts-erhöhenden Hypothesen bestätigt werden konnte. Es wird davon ausgegangen, dass die Endothelzellen soweit dedifferenziert sind, dass sie auf keinen der getesteten Stimuli reagieren. Im Hinblick auf den TEER-Wert erscheint das direkte Ko-Kulturmodell am geeignetsten zu sein, allerdings basiert die TEER-Erhöhung lediglich auf dem zusätzlichen Zellmonolayer. Die weiteren Unterschiede innerhalb der TEER-Werte waren marginal, so dass es nicht möglich ist, die optimalen Kultivierungsbedingungen zu identifizieren.

3. Ist die hCMEC/D3 Zelllinie geeignet für ein *in vivo*-ähnliches statisches Blut-Hirn-Schranke-Modell?

Als minimale funktionelle Anforderung an ein aussagekräftiges *in vitro*-Blut-Hirn-Schranke-Modell für Permeationsstudien ist in der Literatur häufig ein TEER-Wert zwischen 150 und $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ angegeben (Deli et al. 2005; Gaillard und de Boer 2000). In der vorliegenden Arbeit lagen die ermittelten TEER-Werte der humanen Endothelzelllinie mit $\leq 20 \Omega \cdot \text{cm}^2$ weit unter den geforderten Zielwerten. Dies verdeutlicht die unzureichende Barriereintegrität dieser Zelllinie. Auch die Angaben in der Literatur befinden sich unter statischen Bedingungen mit 2 bis $100 \Omega \cdot \text{cm}^2$ mehrheitlich außerhalb dieses Zielbereichs (Rahman et al. 2016). Eine Ausnahme war das Blut-Hirn-Schranke-Modell mit hCMEC/D3 Zellen, das mit einem Zusatz von 100 nM Hydrocortison im Assaymedium TEER-Werte von ungefähr $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ generierte (Förster et al. 2008). Allerdings konnte dieses Ergebnis in der vorliegenden Arbeit nicht repliziert werden. Im Vergleich dazu weisen humane primäre Endothelzellen TEER-Werte auf, die in Abhängigkeit ihres Ursprungs, der Isolierungsmethode und der Kultivierungsbedingungen zwischen 30 und $500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ variieren (Daniels et al. 2013; Urich et al. 2012; Deli et al. 2005; Chen et al. 2003; Zenker et al. 2003). Ebenso wie bei den humanen immortalisierten Endothelzellen befinden sich diese TEER-Werte deutlich unterhalb des physiologischen Bereichs von über $1500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (Butt et al. 1990; Crone und Olesen 1982).

Die vorliegende parametrische Untersuchung hat ergeben, dass äußere Faktoren die Barriereigenschaften der humanen Endothelzelllinie nicht wesentlich beeinflussen, und sie bestätigt damit vorangegangene Studien (Biemans et al. 2017; Eigenmann et al. 2013). Die Ausbildung dichter Zell-Zell-Kontakte ist die Voraussetzung für die Aufrechterhaltung aller wesentlichen Eigenschaften der Blut-Hirn-Schranke (Gaillard und de Boer 2000). Aufgrund der unzureichenden TJ-Expression, der niedrigen TEER-Werte und der hohen Permeationskoeffizienten für Natriumfluoreszein und FITC-Dextran 4 kDa ist die hCMEC/D3 Zelllinie nicht für Permeationsstudien von niedermolekularen Arzneimittelkandidaten geeignet. Für Forschungsfragen, bei denen die Bildung einer restriktiven parazellulären Barriere nicht zwingend erforderlich ist, wie z. B. für Zytotoxizitätsstudien, ist die Endothelzelllinie vielseitig einsetzbar. Einen vielversprechenden alternativen Ansatz stellen stammzellbasierte humane Blut-Hirn-Schranke-Modelle dar (Appelt-Menzel et al. 2017).

4. Lassen sich die Bedingungen der herkömmlichen Kultivierung an eine Kultivierung im *Cerebral DynaMiTES* anpassen?

Zur Umsetzung von dynamischen Kultivierungsbedingungen diente das Zellkulturmodell DynaMiTES, das ursprünglich für dynamische Arzneimittelabsorptionsstudien durch die Kornea konzipiert wurde (Beißner et al. 2018; Mattern et al. 2018). Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden in der vorliegenden Arbeit die Zellviabilitätsuntersuchungen auf die Dichtungsmaterialien und Schläuche ausgeweitet, um eine zellverträgliche Kultivierung im DynaMiTES sicher zu stellen. Hierbei hat sich gezeigt, dass das Dichtungsmaterial CR zu einer leichten und NBR zu einer vollständigen Reduzierung der Zellviabilität führte. Als Konsequenz wurde für alle Dichtungsringe das zellverträgliche Material EPDM eingesetzt.

Für eine Kultivierung im DynaMiTES wurden die Zellen zunächst auf konventionellen Zellkultureinsätzen eingesät und anschließend in das Zellkultursystem durch ein einfaches Steckprinzip überführt. Um einen Medienfluss entlang der Zellen zu gewährleisten, war ein Wechsel der Zellorientierung von normal zu invers erforderlich. Die humane Endothelzelllinie wies bei der inversen Kultivierung eine reduzierte Zellzahl auf. Die Zellzahlreduktion lässt sich auf eine veränderte Oberflächenbeschaffenheit der unteren Membranseite zurückführen, da nur die obere

Membranseite vom Hersteller vorbehandelt wurde. Die Zellmorphologie, die Zellviabilität und die Barriereintegrität waren hingegen vergleichbar mit den normalen Kultivierungsbedingungen. Daher kann das inverse Blut-Hirn-Schranke-Modell als gleichwertig zum normalen Blut-Hirn-Schranke-Modell angesehen werden. Vorangegangene Studien fanden ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Orientierungsausrichtungen eines Lungen- bzw. Darm-Modells, wobei die Zellzahlen in diesen Studien nicht betrachtet wurden (Dinner et al. 2016; Wakabayashi et al. 2007).

Aufgrund der geringen Gasdurchlässigkeit des dynamischen Zellkultursystems wurde nach einer Alternative zu dem Standardmedium EGM-2 gesucht. Die meisten Zellkulturmedien sind so formuliert, dass sie einen konstanten pH-Wert von 7,2 – 7,4 unter 5 % CO₂-Zufuhr erreichen, der sich bei einem geringeren CO₂-Gehalt in den höheren pH-Bereich verschiebt (Schumacher et al. 2002). In Vorversuchen stellte sich für die Kultivierung einer Epithelzelllinie unter atmosphärischen Bedingungen das CO₂-unabhängige Medium (CO₂-IDM) von Gibco® am geeignetsten heraus. Die Kultivierung in CO₂-IDM war für die Endothelzelllinie ebenfalls geeignet. Die Zellen wiesen in dem Medium einen konfluenten Monolayer und eine vergleichbare Zellmorphologie auf. Die Zellviabilität lag mit ungefähr 80 %, verglichen mit dem Standardmedium, ebenfalls in einem tolerierbaren Bereich. Neben kommerziell erhältlichen CO₂-unabhängigen Medien werden für eine Kultivierung außerhalb des CO₂-Inkubators häufig auch bicarbonatreduzierte Medien mit einem HEPES-Zusatz von 10 mM (Huang and Lee 2007) bis 50 mM und mehr eingesetzt (Toh et al. 2007; Schumacher et al. 2002). Allerdings kann HEPES auch negative Auswirkungen auf bestimmte Zelltypen haben, wie embryonale Stammzellen und Chondrozyten (Furue et al. 2008; Poole et al. 1982). Es wurde zudem nachgewiesen, dass in HEPES-gepufferten Medien während der Exposition mit sichtbarem Licht vermehrt zytotoxische Produkte, insbesondere Wasserstoffperoxid, entstehen (Zigler et al. 1985). Um mögliche Einflüsse auf die Zelleigenschaften durch veränderte Zellkultivierungsbedingungen im DynaMiTES zu vermeiden, gibt es noch weitere Alternativen zur Sicherstellung des physiologischen pH-Wertes. Hierzu zählen u. a. die Verwendung eines separaten Mediumreservoirs mit CO₂-Austausch (Kim et al. 2007; Schumacher et al. 2002) oder der Austausch der oberen DynaMiTES-Ebene durch einen

semipermeablen Verschluss, wie er in dieser Arbeit für Kultivierungszeiten über 24 h verwendet wurde (Abschnitt 3.2.8.2).

Die Weiterentwicklung zum *Cerebral* DynaMiTES ist erfolgreich verlaufen und nur leichte Modifikationen sind für die Anpassung an eine Kultivierung im DynaMiTES erforderlich. Die zerebralen Endothelzellen lassen sich invers kultivieren und das CO₂-IDM stellt eine ausreichende Alternative zum Standardmedium für die Kurzzeitkultivierung im DynaMiTES dar. Für die Langzeitkultivierung wurde in einem angepassten Versuchsaufbau das Standardmedium verwendet.

5. Welchen Einfluss hat eine Kultivierung im *Cerebral* DynaMiTES auf die Eigenschaften der hCMEC/D3 Zellen?

Das Zellkultursystem DynaMiTES hat den Vorteil, dass die Zellen unter einer dynamischen Medienversorgung kultiviert werden können. Der Fluss des Zellkulturmediums übt auf den Zellmonolayer eine Scherspannung aus, die für ein *in vivo*-ähnliches Zellkulturmodell von großer Relevanz ist (Griep et al. 2013). Die statische und dynamische Kultivierung der hCMEC/D3 Zellen im DynaMiTES erfolgte nach einer statischen Vorkultivierung in Standard-12-Well-Zellkulturplatten über einen Kultivierungszeitraum von 3 bzw. 72 h. Bei der Kurzzeitkultivierung wurden Flussraten bis 3,33 ml/min mit einer Scherspannung von $3,9 \cdot 10^{-3}$ Pa von den Endothelzellen gut vertragen, ersichtlich an Zellviabilitäten und Zellzahlen, die sich im Bereich der Kontrollzellen befanden. Wurde der Kultivierungszeitraum auf 72 h verlängert, zeigten die Zellen bei einer Flussrate von 0,03 ml/min ($3,9 \cdot 10^{-5}$ Pa) eine vergleichbare Verträglichkeit. Höhere Flussraten führten bei der Langzeitkultivierung vermehrt zu Undichtigkeiten des Systems und wurden aus diesem Grund nicht berücksichtigt. Darüber hinaus wurde nach einer Kultivierung im DynaMiTES die Barriereintegrität der Zellen untersucht. Unabhängig von den untersuchten Flussbedingungen und den daraus resultierenden Scherbeanspruchungen blieb der TEER-Wert der hCMEC/D3 Zellen unverändert. Walter et al. untersuchten ebenfalls den Einfluss von Scherspannungen unterhalb des physiologischen Bereichs von 0,3 bis 2 Pa (van der Helm et al. 2016a) auf die Barriereigenschaften von Endothelzellen. Sie beobachteten bei $1,5 \cdot 10^{-2}$ Pa keinen deutlichen TEER-Anstieg bei den hCMEC/D3 Zellen (Walter et al. 2016). Auch Partyka et al. haben unterhalb der physiologischen

Scherspannung ein mikrofluidisches Zellkultursystem mit der hCMEC/D3 Zelllinie etabliert. In diesem wurden die Endothelzellen gemeinsam mit primären humanen Astrozyten in einem mikrovaskulären Hydrogel kultiviert und über vier Tage einer Scherspannung von $5,0 \cdot 10^{-2}$ Pa ausgesetzt. Ab dem dritten Tag kam es zu einem signifikanten Anstieg des TEER-Wertes von ungefähr $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ zu $1000 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Die absoluten TEER-Werte sind mit Vorsicht zu interpretieren, da sie die bisherigen statischen *in vitro*-Messungen von hCMEC/D3 Monolayern um eine Zehnerpotenz übertreffen. Partyka et al. führten dieses Phänomen auf den zusätzlichen Widerstand des Hydrogels zurück (Partyka et al. 2017). Innerhalb des physiologischen Bereichs konnten Griep et al. nach einer dynamischen Kultivierung für 18 h bei einer Scherspannung von $5,8 \cdot 10^{-1}$ Pa einen Anstieg des TEER-Wertes um den Faktor 3, auf $120 \Omega \cdot \text{cm}^2$ beobachten (Griep et al. 2013). Darüber hinaus berichteten Cucullo et al. über einen 15-fach höheren TEER-Wert, bis $1200 \Omega \cdot \text{cm}^2$, nach einer Kultivierung bei einer Scherspannung von 1 bis $4 \cdot 10^{-1}$ Pa für 14 Tage (Cucullo et al. 2008). Ein direkter Vergleich der in der Literatur angegebenen TEER-Ergebnisse wird durch die Verwendung unterschiedlicher Zellkultursysteme, Kultivierungsbedingungen, Elektrodendesigns und Messgeräte erschwert (Sheller et al. 2017; Czupalla et al. 2014). Cucullo et al. haben beispielsweise die statische und dynamische Kultivierung nicht in ein und demselben mikrofluidischen System durchgeführt und miteinander verglichen, was zu einer experimentellen Variabilität führen kann (Cucullo et al. 2007).

Eine mögliche Ursache für die unveränderten Barriereigenschaften der Endothelzellen im DynaMiTES ist die relativ geringere Scherspannung von $3,9 \cdot 10^{-5}$ Pa, die deutlich unter den Druckverhältnissen der zerebralen Endothelzellen *in vivo* liegt. Die Scherspannung im DynaMiTES wird durch die Flussrate und die Kanalgeometrie begrenzt. Die Kanalgeometrie ist darauf ausgelegt, die Volumina im Akzeptor- sowie Donor-Kompartiment mit denen der konventionellen Kultivierung in der 12-Well-Zellkulturplatte vergleichbar zu gestalten. Das bringt den Vorteil, dass eine direkte Gegenüberstellung zwischen den statischen Ergebnissen in der 12-Well-Zellkulturplatte und im DynaMiTES ermöglicht wird. Um zukünftig höhere Scherspannungen im DynaMiTES realisieren zu können und die *in vitro-in vivo*-Korrelation zu verbessern, sind weitere Modifikationen der Kanalstruktur und die Anwendung von höheren Flussraten erforderlich. Für den Einsatz von höheren Flussraten ist eine ausreichende

Dichtigkeit des Systems Voraussetzung. Hinsichtlich der Undichtigkeiten wurden erste Lösungsversuche durch die Verwendung einer klebenden Acrylatfolie oder eines dichtenden Silikonklebers zwischen der mittleren und der unteren Ebene erarbeitet. Beide Materialien sind zellverträglich und dichten das System vollständig ab. Umfangreiche Kultivierungsstudien im abgedichteten System mit variierenden Flussraten stehen hierzu allerdings noch aus. Ein Nachteil dieser Variante ist, dass dadurch der flexible und modulare Ansatz teilweise verloren geht und die Reinigung erschwert wird, so dass zukünftig nach weiteren Lösungsansätzen, wie z. B. alternativen Hülsensystemen, gesucht werden sollte.

6. Ist das DynaMiTES für weitere Zelllinien anwendbar und welche Möglichkeiten ergeben sich hieraus?

Die Epithelzelllinie MDCK wurde aufgrund ihrer guten Barriereigenschaften mit TEER-Werten über $3500 \Omega \cdot \text{cm}^2$ für die Untersuchung des weiterentwickelten Elektrodendesigns im DynaMiTES verwendet. Die integrierten Elektroden ermöglichen eine kontinuierliche TEER-Messung zur Überwachung der zellulären Barriereintegrität. Gegenüber flexiblen Elektroden haben sie den Vorteil, dass keine TEER-Schwankungen durch Änderungen der Position möglich sind (van der Helm et al. 2016a). Das Einsteckprinzip von Zellkultureinsätzen ins DynaMiTES erleichterte einen direkten Vergleich zwischen den DynaMiTES-Elektroden und den herkömmlichen Elektroden. Es wurden reproduzierbare TEER-Werte ermittelt, die vergleichbar mit denen der herkömmlichen STX2®-Elektrode waren.

Über einen Zeitraum von 3 h wurde bei der statischen Kultivierung der MDCK Zellen im DynaMiTES eine deutliche TEER-Wertsenkung festgestellt. Zudem traten nach einer solchen Kultivierung häufig Veränderungen im Monolayer auf, von leichten Ablösungstendenzen bis hin zu Löchern. Während bei einer Kultivierung mit Caco-2 Zellen ebenfalls eine TEER-Reduktion beobachtet wurde, ließen sich cEND Zellen vergleichbar mit den hCMEC/D3 Zellen ohne eine Einschränkung kultivieren. Das belegt, dass eine Kultivierung im DynaMiTES mit verschiedenen Zelllinien durchführbar ist, wobei diese unterschiedlich auf die Bedingungen im DynaMiTES reagieren. Es scheint, als ob insbesondere Monolayer von Zelllinien mit hohen TEER-Werten, ähnlich wie bei den Zelllinien Caco-2 und MDCK, negativ beeinflusst werden.

Eine Ursache für die TEER-Reduktion im DynaMiTES ist der in der mittleren Ebene befindliche Dichtungsring. Dieser ist notwendig, damit die Akzeptor-Lösung und die Donor-Lösung ausschließlich über den Zellmonolayer miteinander im Austausch stehen. Die Verwendung von Dichtungsringen mit unterschiedlichen Eigenschaften führte bisher zu keiner Verbesserung. Um den Dichtungsring in der mittleren Ebene möglichst zu vermeiden, müssen alternative Dichtungsprinzipien geprüft werden. Außerdem sollten die Untersuchungen möglicher Einflussfaktoren sowie die Kultivierungsversuche im DynaMiTES mit weiteren barriereformenden Zelllinien fortgeführt werden, um zukünftig eine Kultivierung diverser Zelllinien im DynaMiTES zu ermöglichen.

Im Vergleich dazu beobachteten Beißner et al. bei dem humanen Cornea-Konstrukt während einer dreistündigen Permeationsuntersuchungen im *Ocular* DynaMiTES keine Veränderung der TEER-Werte (Beißner et al. 2018). In dem Konstrukt sind Keratinozyten (HCK) in ein Kollagengel eingebettet und Epithelzellen (HCE-T) aufgesät. Möglicherweise würde auch bei anderen Zelllinien die Verwendung eines Gels vorteilhaft sein. Die Herausforderung besteht hierbei serumfreie Kultivierungsbedingungen zu finden, um eine Kontraktion des Gels zu verhindern.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine DynaMiTES-Kultivierung prinzipiell mit verschiedenen Zelllinien realisierbar ist. So ist neben einer Anwendung als *Ocular* oder *Cerebral* DynaMiTES auch die Kultivierung weiterer *in vitro*-Zellkulturmodelle denkbar. Zu den Vorteilen zählen die TEER-Messung in Echtzeit, die gute Vergleichbarkeit mit Ergebnissen aus dem Transwell™-Modell, der modulare Aufbau und der damit flexible Einsatz bestimmter Ebenen sowie eine Zelleinsaat außerhalb des Systems. Das *Cerebral* DynaMiTES bietet zukünftig die Möglichkeit die *in vitro-in vivo*-Korrelation zu verbessern, um als Modell für die präklinische Forschung zerebraler Arzneistoffe eingesetzt zu werden. Im Unterschied zu einigen anderen dynamischen Zellkultursystemen (Cucullo et al. 2013) ist das DynaMiTES weniger komplex aufgebaut. Das erleichtert die Übertragbarkeit von bestehenden Protokollen und die routinemäßige Anwendung. Neben den vielen potentiellen Anwendungsmöglichkeiten verdeutlichen die vorliegenden Ergebnisse ebenso, dass weitere Optimierungsschritte insbesondere hinsichtlich des inneren Dichtungsringes und der äußeren Hüllen erforderlich sind.

6 Zusammenfassung

In der Arzneimittelentwicklung zur Therapie zentralnervöser Erkrankungen stellt die Blut-Hirn-Schranke durch ihre strukturelle und funktionelle Integrität ein Hindernis für viele Arzneistoffe dar. Um bereits in der frühen Entwicklungsphase die Durchlässigkeit potentieller Wirkstoffe abschätzen zu können, sind zuverlässige und realitätsnahe *in vitro*-Zellkulturmodelle erforderlich. Eine breite Anwendung für die Etablierung von Blut-Hirn-Schranke-Modellen findet die humane Endothelzelllinie hCMEC/D3. Neben den Vorteilen von immortalisierten Zelllinien stellen ihre mäßig restriktiven Barriereigenschaften einen erheblichen Nachteil dar. Eine Erklärung für ihre geringe Barriereintegrität und der hohen Durchlässigkeit für Natriumfluoreszein und FITC-Dextran 4 kDa lieferte die immunzytochemische Untersuchung wichtiger TJ-Proteine. So waren Occludin, ZO-1 und Claudin-5 größtenteils zytosolisch lokalisiert und nicht wie erwartet intramembranös. Von dieser Ausgangssituation ausgehend wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene statische sowie dynamische Kultivierungsvariationen zur Verbesserung der Barrierefunktionalität analysiert.

Zunächst wurde der Einfluss von zehn unterschiedlichen Zellkulturmedien auf die Proliferationseigenschaften der Zellen, die Barriereintegrität und die Genexpression von Zell-Zell-Kontaktproteinen untersucht. Die Zellkulturmedien ECGM MV-2, MCDB 131 und das serumfreie Medium hESFM stellten sich neben dem Standardmedium EGM-2 am geeignetsten heraus. Allerdings zeigte keine der untersuchten Medienvarianten einen positiven Einfluss auf die endotheliale Barrierewirksamkeit. Dennoch hat eine serumfreie Kultivierung mit hESFM den Vorteil, dass im Unterschied zu einer Kultivierung mit dem chargenvariablen Serum Ergebnisse zwischen Forschungsgruppen vergleichbarer sind.

Auch die Variationen verschiedener Beschichtungsmaterialien (Laminin, Kollagen, und Fibronectin), Medienzusätzen (Serum, Hydrocortison, Calcium und pCPT-cAMP kombiniert mit Ro-20-1724), Porendichten (0,4, 1,0, 3,0 μm) und Ko-Kultivierungsvariationen (direkt und indirekt mit SVGmm) verbesserten die Barriereintegrität der hCMEC/D3 Zellen nicht. Die höchsten TEER-Werte wurden in der direkten Ko-Kultur mit der humanen Astrozytenzelllinie SVGmm generiert, obgleich die TEER-Erhöhung lediglich auf die Bildung eines weiteren Zellmonolayers zurückzuführen ist.

Darüber hinaus wurde der Einfluss dynamischer Kultivierungsbedingungen unter Anwendung des Zellkulturmodells DynaMiTES untersucht, das die Vorteile statischer Zellkultureinsätze mit denen mikrofluidischer Modelle vereint. Die Kultivierungsbedingungen wurden erfolgreich an das DynaMiTES-Design angepasst, indem die Aussaatrichtung von normal auf invers geändert wurde. Die Endothelzellen wurden bei einer Flussrate bis 3,33 ml/min für 3 h und bei einer Flussrate von 0,03 ml/min für 72 h ohne einen Verlust der Zellviabilität und der Zellzahl kultiviert. Höhere Flussraten führten bei der Langzeitkultivierung zu Undichtigkeiten des Systems und wurden daher nicht weiter verfolgt.

Unter allen untersuchten Flussraten blieben die TEER-Werte der Endothelzellen unverändert. Möglicherweise ist dieses Ergebnis auf die relativ geringe Scherbeanspruchung zurückzuführen, die im DynaMiTES mit $3,9 \cdot 10^{-3}$ bis $3,9 \cdot 10^{-5}$ Pa unter dem physiologischen Bereich (0,3 – 2 Pa) lag. Neben den humanen Endothelzellen ließ sich auch die murine Endothelzelllinie cEND statisch sowie dynamisch im DynaMiTES kultivieren. Demgegenüber wurde während der statischen DynaMiTES-Kultivierung der Zelllinien MDCK und Caco-2 eine TEER-Wertsenkung festgestellt. Hierbei scheint insbesondere der Dichtungsring in der mittleren DynaMiTES-Ebene einen entscheidenden Einflussfaktor darzustellen. Weitere Untersuchungen und Optimierungen sind erforderlich, um zukünftig eine Zellkultivierung diverser Zelllinien im DynaMiTES zu ermöglichen.

Die Ausbildung dichter Zell-Zell-Kontakte ist eine Voraussetzung für die restriktiven Eigenschaften der Blut-Hirn-Schranke. Als Mindestanforderung für ein *in vitro*-Blut-Hirn-Schranke-Modell mit einer immortalisierten Zelllinie wird ein TEER-Wert zwischen 150 und $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ gefordert (Deli et al. 2005; Gaillard und de Boer 2000). Angesichts dessen verdeutlicht die vorliegende Arbeit, dass die hCMEC/D3 Zelllinie, trotz der getesteten Kultivierungsvariationen, nicht für Permeationsstudien von niedermolekularen Arzneimittelkandidaten geeignet ist. Somit bleibt der Bedarf nach einer Zelllinie mit restriktiven Barriereigenschaften weiterhin bestehen. Eine potentielle TEER-Steigerung der hCMEC/D3 Zellen durch Scherspannungen im physiologischen Bereich könnte zukünftig im DynaMiTES nach einer Modifikation der Kanalstruktur und der Anwendung von höheren Flussraten untersucht werden.

7 Abstract

The blood-brain barrier, mainly consisting of endothelial cells, pericytes and astrocytes, separates the central nervous system and the blood circulation to provide vital homeostasis. Due to its structural and functional integrity it is challenging for the therapeutic treatment of central nervous system disorders. Therefore, reliable *in vitro* cell culture models for the estimation of brain accessibility in the early phase of drug development and thus the reduction of drug failure are needed. In brain research, the human endothelial cell line hCMEC/D3 is widely used for the establishment of blood-brain barrier models. Besides the advantages of immortalized cell lines, its moderately restrictive barrier properties are a considerable disadvantage. The low barrier integrity and high permeability for sodium fluorescein and FITC-dextran 4 kDa might be due to the incomplete formation of tight junction proteins. Thus, ZO-1, occludin and claudin-5 were mostly cytosolically localized and not intramembranously, as expected. Based on this, various static and dynamic cultivation variations were analyzed to improve barrier functionality of hCMEC/D3 cells regarding an *in vivo*-like blood-brain barrier model for drug permeation studies.

Firstly, the effect of ten different cell culture media, including two serum-free ones, on the proliferation properties, barrier integrity and gene expression of tight junction proteins of hCMEC/D3 cells was investigated. Besides the standard medium EGM-2, the basal media ECGM MV-2, MCDB 131 and the serum-free medium hESFM seemed to be most suitable. Though, none of the tested cell culture media showed a positive effect on the barrier integrity of the endothelial cell line. However, the serum-free cultivation with hESFM has the advantage that the results are more comparable between research groups compared to the cultivation with the batch-variable serum.

Variations of different coating materials (laminin, collagen and fibronectin), media supplements (serum, hydrocortisone, calcium and pCPT-cAMP combined with Ro-20-1724), pore densities (0.4, 1.0, 3.0 μm) and co-cultivation variations (directly and indirectly with SVGmm) did not improve the barrier integrity of the hCMEC/D3 cells. The highest TEER values were generated in direct co-culture with the human astrocyte cell line, although the increase in TEER was mainly caused by the formation of a further cell monolayer.

Furthermore, the endothelial cell line was cultivated under dynamic conditions using the cell culture model DynaMiTES, which combines the advantages of static cell culture inserts with those of microfluidic models. The cultivation conditions were successfully adapted to the DynaMiTES design by changing the seeding orientation from normal to inverse. Furthermore, the endothelial cells were cultivated for 3 h at a flow rate up to 3.33 ml/min and for 72 h at a flow rate of 0.03 ml/min without loss of cell viability and cell count. During long-term cultivation, higher flow rates above 0.03 ml/min resulted in system leakage and were therefore not considered.

However, the barrier integrity of the endothelial cell line remained unchanged under all dynamic conditions. This might be due to the relatively low shear stress from $3.9 \cdot 10^{-3}$ to $3.9 \cdot 10^{-5}$ Pa in DynaMiTES, which was below the physiological range of around 0.3 to 2 Pa. In addition to human endothelial cells, the murine endothelial cell line cEND could also be cultivated statically and dynamically in DynaMiTES. In contrast, a reduction of barrier integrity was observed during static DynaMiTES cultivation of the cell lines MDCK and Caco-2. Here, the sealing ring in the middle level of the DynaMiTES represented a critical impact factor. This indicates that the application as dynamic cell culture model is feasible, yet requires further testing, wider usage and improvements to enable the cultivation of various cell lines in DynaMiTES.

The formation of tight cell-cell contacts is essential for the restrictive properties of the blood-brain barrier. The minimum requirement for an *in vitro* blood-brain barrier model with an immortalized cell line is a TEER value between 150 and 200 $\Omega \cdot \text{cm}^2$ (Deli et al. 2005; Gaillard und de Boer 2000). Hence, the present work shows that the hCMEC/D3 cell line is not suitable for permeation studies of small molecule drug candidates due to the incomplete TJ expression, the low TEER values and the high permeation coefficients for sodium fluorescein and FITC-dextran 4 kDa. Even after the tested cultivation variations the hCMEC/D3 model showed considerable limitations and therefore the need for an alternative cell line with restrictive barrier properties remains. A potential increase in TEER of hCMEC/D3 cells due to shear stress in the physiological range could be investigated in DynaMiTES in the future after modification of the channel structure and the application of higher flow rates.

8 Literaturverzeichnis

- Abbott, N. J. (2013): Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. In *Journal of inherited metabolic disease* 36 (3), pp. 437–449. DOI: 10.1007/s10545-013-9608-0.
- Abbott, N. J.; Patabendige, A. A. K.; Dolman, D. E. M.; Yusof, S. R.; Begley, D. J. (2010): Structure and function of the blood-brain barrier. In *Neurobiology of disease* 37 (1), pp. 13–25. DOI: 10.1016/j.nbd.2009.07.030.
- Abbott, N. J.; Rönnbäck, L.; Hansson, E. (2006): Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. In *Nature reviews. Neuroscience* 7 (1), pp. 41–53. DOI: 10.1038/nrn1824.
- Aday, S.; Cecchelli, R.; Hallier-Vanuxeem, D.; Dehouck, M. P.; Ferreira, L. (2016): Stem cell-based human blood-brain barrier models for drug discovery and delivery. In *Trends in Biotechnology* 34 (5), pp. 382–393. DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.01.001.
- Adriani, G.; Ma, D.; Pavesi, A.; Kamm, R. D.; Goh, E. L. K. (2017): A 3D neurovascular microfluidic model consisting of neurons, astrocytes and cerebral endothelial cells as a blood-brain barrier. In *Lab on a chip* 17 (3), pp. 448–459. DOI: 10.1039/c6lc00638h.
- Al-Shehri, A.; Favretto, M. E.; Ioannou, P. V.; Romero, I. A.; Couraud, P.-O.; Weksler, B. B. et al. (2015): Permeability of PEGylated immunoarsonoliposomes through in vitro blood brain barrier-medulloblastoma co-culture models for brain tumor therapy. In *Pharmaceutical research* 32 (3), pp. 1072–1083. DOI: 10.1007/s11095-014-1519-8.
- Amin, A.; Kandil, H.; Soliman, A.; Rabia, A. M.; El. Nashar, D. E.; Ismail, M. N. (2018): Assessment of modified rice husk powder/ethylene propylene diene monomer (EPDM) nanocomposites for biomedical applications. In *Polym. Compos.* 39, E500-E507. DOI: 10.1002/pc.24638.
- Appelt-Menzel, A.; Cubukova, A.; Günther, K.; Edenhofer, F.; Piontek, J.; Krause, G. et al. (2017): Establishment of a human blood-brain barrier co-culture model mimicking the neurovascular unit using induced pluri- and multipotent stem cells. In *Stem cell reports* 8 (4), pp. 894–906. DOI: 10.1016/j.stemcr.2017.02.021.
- Araújo, E. S.; Khoury, H. J.; Silveira, S. V. (1998): Effects of gamma-irradiation on some properties of durolon polycarbonate. In *Radiation Physics and Chemistry* 53 (1), pp. 79–84. DOI: 10.1016/S0969-806X(97)00300-9.

- Argaw, A. T.; Asp, L.; Zhang, J.; Navrazhina, K.; Pham, T.; Mariani, J. N. et al. (2012): Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. In *The Journal of clinical investigation* 122 (7), pp. 2454–2468. DOI: 10.1172/JCI60842.
- Armulik, A.; Genové, G.; Mäe, M.; Nisancioglu, M. H.; Wallgard, E.; Niaudet, C. et al. (2010): Pericytes regulate the blood-brain barrier. In *Nature* 468 (7323), pp. 557–561. DOI: 10.1038/nature09522.
- Arnaoutova, I.; George, J.; Kleinman, H. K.; Benton, G. (2009): The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. In *Angiogenesis* 12 (3), pp. 267–274. DOI: 10.1007/s10456-009-9146-4.
- Avdeef, A.; Deli, M. A.; Neuhaus, W. (2015): In vitro assays for assessing BBB permeability. artificial membrane and cell culture models. In *Blood-Brain Barrier in Drug Discovery: Optimizing Brain Exposure of CNS Drugs and Minimizing Brain Side Effects for Peripheral Drugs*, John Wiley & Sons, New Jersey, pp. 188–237. DOI:10.1002/9781118788523
- Bai, Y.; Zhu, X.; Chao, J.; Zhang, Y.; Qian, C.; Li, P. et al. (2015): Pericytes contribute to the disruption of the cerebral endothelial barrier via increasing VEGF expression. Implications for stroke. In *PLoS ONE* 10 (4), e0124362. DOI: 10.1371/journal.pone.0124362.
- Baker, M. (2016): Reproducibility. Respect your cells! In *Nature* 537 (7620), pp. 433–435. DOI: 10.1038/537433a.
- Balda, M. S.; Whitney, J. A.; Flores, C.; González, S.; Cereijido, M.; Matter, K. (1996): Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. In *The Journal of Cell Biology* 134 (4), pp. 1031–1049. DOI: 10.1083/jcb.134.4.1031.
- Bang, S.; Lee, S.-R.; Ko, J.; Son, K.; Tahk, D.; Ahn, J. et al. (2017): A low permeability microfluidic blood-brain barrier platform with direct contact between perfusable vascular network and astrocytes. In *Scientific reports* 7 (1), p. 8083. DOI:10.1038/s41598-017-07416-0
- Bauer, H.-C.; Krizbai, I. A.; Bauer, H.; Traweger, A. (2014): "You shall not pass"-tight junctions of the blood brain barrier. In *Frontiers in neuroscience* 8, p. 392. DOI: 10.3389/fnins.2014.00392.

- Beißner, N.; Lorenz, T.; Reichl, S. (2016): Organ on chip. In *Microsystems for pharmatechnology. Manipulation of fluids, particles, droplets, and cells*. Springer, Cham pp. 299–339. DOI: 10.1007/978-3-319-26920-7_11.
- Beißner, N.; Mattern, K.; Dietzel, A.; Reichl, S. (2018): DynaMiTES - a dynamic cell culture platform for in vitro drug testing PART 2 - Ocular DynaMiTES for drug absorption studies of the anterior eye. In *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics* 126, pp 166-176. DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.03.021.
- Berndt, P.; Winkler, L.; Cording, J.; Breitzkreuz-Korff, O.; Rex, A.; Dithmer, S. et al. (2019): Tight junction proteins at the blood-brain barrier. Far more than claudin-5. In *Cellular and molecular life sciences* 76 (10), pp. 1987–2002. DOI: 10.1007/s00018-019-03030-7.
- Bertolotti, R. L.; Hurst, V. (1978): Inhibition of corrosion during autoclave sterilization of carbon steel dental instruments. In *Journal of the American Dental Association (1939)* 97 (4), pp. 628–632. DOI: 10.14219/jada.archive.1978.0335.
- Bettinger, C. J.; Weinberg, E. J.; Kulig, K. M.; Vacanti, J. P.; Wang, Y.; Borenstein, J. T.; Langer, R. (2005): Three-dimensional microfluidic tissue-engineering scaffolds using a flexible biodegradable polymer. In *Advanced materials* 18 (2), pp. 165–169. DOI:10.1002/adma.200500438.
- Bickel, U. (2005): How to measure drug transport across the blood-brain barrier. In *NeuroRx* 2 (1), pp. 15–26. DOI: 10.1602/neurorx.2.1.15.
- Bicker, J.; Alves, G.; Fortuna, A.; Falcão, A. (2014): Blood-brain barrier models and their relevance for a successful development of CNS drug delivery systems: a review. In *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics* 87 (3), pp. 409–432. DOI: 10.1016/j.ejpb.2014.03.012.
- Biegel, D.; Spence, D. D.; Pachter, J. S. (1995): Isolation and culture of human brain microvessel endothelial cells for the study of blood-brain barrier properties in vitro. In *Brain research* 692 (1-2), pp. 183–189.
- Biemans, E. A. L. M.; Jäkel, L.; Waal, R. M. W. de; Kuiperij, H. B.; Verbeek, M. M. (2017): Limitations of the hCMEC/D3 cell line as a model for A β clearance by the human blood-brain barrier. In *Journal of neuroscience research* 95 (7), pp. 1513–1522. DOI: 10.1002/jnr.23964.
- Booth, R.; Kim, H. (2014): Permeability analysis of neuroactive drugs through a dynamic microfluidic in vitro blood-brain barrier model. In *Annals of Biomedical Engineering* 42 (12), pp. 2379–2391. DOI: 10.1007/s10439-014-1086-5.

- Brendel, K.; Meezan, E.; Carlson, E. C. (1974): Isolated brain microvessels. A purified, metabolically active preparation from bovine cerebral cortex. In *Science* 185 (4155), pp. 953–955. DOI: 10.1126/science.185.4155.953.
- Briske-Anderson, M. J.; Finley, J. W.; Newman, S. M. (1997): The influence of culture time and passage number on the morphological and physiological development of Caco-2 cells. In *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine* 214 (3), pp. 248–257. DOI: 10.3181/00379727-214-44093.
- Brown, J. A.; Pensabene, V.; Markov, D. A.; Allwardt, V.; Neely, M. D.; Shi, M. et al. (2015): Recreating blood-brain barrier physiology and structure on chip: A novel neurovascular microfluidic bioreactor. In *Biomicrofluidics* 9 (5), p. 54124. DOI: 10.1063/1.4934713.
- Brown, R. C.; Morris, A. P.; O'Neil, R. G. (2007): Tight junction protein expression and barrier properties of immortalized mouse brain microvessel endothelial cells. In *Brain research* 1130 (1), pp. 17–30. DOI: 10.1016/j.brainres.2006.10.083.
- Brown, T. D.; Nowak, M.; Bayles, A. V.; Prabhakarparandian, B.; Karande, P.; Lahann, J. et al. (2018): A microfluidic model of human brain (μ HuB) for assessment of blood brain barrier. In *Bioengineering & Translational Medicine* 4 (2), e10126. DOI: 10.1002/btm2.10126.
- Brunelle, D. J. (2005): Advances in polycarbonates. An overview. In *Advances in polycarbonates*, 898, pp. 1–5. DOI: 10.1021/bk-2005-0898.ch001.
- Bunge, F.; van den Driesche, S.; Waite, A.; Mirastschijski, U.; Vellekoop, M. J. (2017): μ Respirometer to determine the oxygen consumption rate of mammalian cells in a microfluidic cell culture. In *2017 IEEE 30th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)*, pp. 414–417.
- Bur, M.; Rothen-Rutishauser, B.; Huwer, H.; Lehr, C.-M. (2009): A novel cell compatible impingement system to study in vitro drug absorption from dry powder aerosol formulations. In *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics* 72 (2), pp. 350–357. DOI: 10.1016/j.ejpb.2008.07.019.
- Burek, M.; Salvador, E.; Förster, C. Y. (2012): Generation of an immortalized murine brain microvascular endothelial cell line as an in vitro blood brain barrier model. In *JoVE* (66). DOI: 10.3791/4022.

- Bussolari, S. R.; Dewey, C. F.; Gimbrone, M. A. (1982): Apparatus for subjecting living cells to fluid shear stress. In *The Review of scientific instruments* 53 (12), pp. 1851–1854. DOI: 10.1063/1.1136909.
- Butt, A. M.; Jones, H. C.; Abbott, N. J. (1990): Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats: a developmental study. In *The Journal of Physiology* 429 (1), pp. 47–62. DOI: 10.1113/jphysiol.1990.sp018243.
- Carl, S. M.; Lindley, D. J.; Das, D.; Couraud, P. O.; Weksler, B. B.; Romero, I. et al. (2010): ABC and SLC transporter expression and proton oligopeptide transporter (POT) mediated permeation across the human blood--brain barrier cell line, hCMEC/D3 corrected. In *Molecular pharmaceutics* 7 (4), pp. 1057–1068. DOI: 10.1021/mp900178j.
- Ceccarini, C.; Eagle, H. (1971): pH as a determinant of cellular growth and contact inhibition. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 68 (1), pp. 229–233. DOI: 10.1073/pnas.68.1.229.
- Cecchelli; Dehouck; Descamps; Fenart; Buée-Scherrer; Duhem et al. (1999): In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. In *Advanced Drug Delivery Reviews* 36 (2-3), pp. 165–178.
- Cecchelli, R.; Aday, S.; Sevin, E.; Almeida, C.; Culot, M.; Dehouck, L. et al. (2014): A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. In *PLoS ONE* 9 (6), pp. e99733. DOI: 10.1371/journal.pone.0099733.
- Chanda, Manas; Roy, Salil K. (2008): Industrial polymers, specialty polymers, and their applications: CRC Press.
- Chen, L.; Liu, W.; Wang, P.; Xue, Y.; Su, Q.; Zeng, C.; Shang, X. (2015): Endophilin-1 regulates blood-brain barrier permeability via EGFR-JNK signaling pathway. In *Brain research* 1606, pp. 44–53. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.02.032.
- Chen, S. H. M.; Stins, M. F.; Huang, S.-H.; Chen, Y. H.; Kwon-Chung, K. J.; Chang, Y. et al. (2003): *Cryptococcus neoformans* induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells. In *Journal of medical microbiology* 52 (Pt 11), pp. 961–970. DOI: 10.1099/jmm.0.05230-0.
- Clough, R. L.; Gillen, K. T.; Malone, G. M.; Wallace, J. S. (1996): Color formation in irradiated polymers. In *Radiation Physics and Chemistry* 48 (5), pp. 583–594. DOI: 10.1016/0969-806X(96)00075-8.

- Coomber, B. L.; Stewart, P. A. (1985): Morphometric analysis of CNS microvascular endothelium. In *Microvascular Research* 30 (1), pp. 99–115. DOI: 10.1016/0026-2862(85)90042-1.
- Cornford, E. M.; Braun, L. D.; Oldendorf, W. H. (1978): Carrier mediated blood-brain barrier transport of choline and certain choline analogs. In *J Neurochem* 30 (2), pp. 299–308. DOI:10.1111/j.1471-4159.1978.tb06530.x
- Crone, C.; Olesen, S. P. (1982): Electrical resistance of brain microvascular endothelium. In *Brain research* 241 (1), pp. 49–55. DOI: 10.1016/0006-8993(82)91227-6.
- Cucullo, L.; Couraud, P. O.; Weksler, B. B.; Romero, I. A.; Hossain, M. T.; Rapp, E.; Janigro, D. (2008): Immortalized human brain endothelial cells and flow-based vascular modeling: A marriage of convenience for rational neurovascular studies. In *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 28 (2), pp. 312–328. DOI: 10.1038/sj.jcbfm.9600525.
- Cucullo, L.; Hossain, M.; Puvenna, V.; Marchi, N.; Janigro, D. (2011a): The role of shear stress in blood-brain barrier endothelial physiology. In *BMC neuroscience* 12, p. 40. DOI: 10.1186/1471-2202-12-40.
- Cucullo, L.; Hossain, M.; Tierney, W.; Janigro, D. (2013): A new dynamic in vitro modular capillaries-venules modular system: cerebrovascular physiology in a box. In *BMC neuroscience* 14, p. 18. DOI: 10.1186/1471-2202-14-18.
- Cucullo, L.; Hossain, M. T.; Rapp, E.; Manders, T. R.; Marchi, N.; Janigro, D. (2007): Development of a humanized in vitro blood-brain barrier model to screen for brain penetration of antiepileptic drugs. In *Epilepsia* 48 (3), pp. 505–516. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2006.00960.x.
- Cucullo, L.; Marchi, N.; Hossain, M.; Janigro, D. (2011b): A dynamic in vitro BBB model for the study of immune cell trafficking into the central nervous system. In *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 31 (2), pp. 767–777. DOI: 10.1038/jcbfm.2010.162.
- Cucullo, L.; McAllister, M. S.; Kight, K.; Krizanac-Bengez, L.; Marroni, M.; Mayberg, M. R. et al. (2002): A new dynamic in vitro model for the multidimensional study of astrocyte-endothelial cell interactions at the blood-brain barrier. In *Brain research* 951 (2), pp. 243–254. DOI: 10.1016/s0006-8993(02)03167-0
- Czupalla, C. J.; Liebner, S.; Devraj, K. (2014): In vitro models of the blood-brain barrier. In *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1135, pp. 415–437. DOI: 10.1007/978-1-4939-0320-7_34.

- Damiati, S.; Kompella, U. B.; Damiati, S. A.; Kodzius, R. (2018): Microfluidic devices for drug delivery systems and drug screening. In *Genes* 9 (2). DOI: 10.3390/genes9020103.
- Daneman, R.; Prat, A. (2015): The blood-brain barrier. In *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (1), a020412. DOI: 10.1101/cshperspect.a020412.
- Daneman, R.; Zhou, L.; Kebede, A. A.; Barres, B. A. (2010): Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. In *Nature* 468 (7323), pp. 562–566. DOI: 10.1038/nature09513.
- Daniels, B. P.; Cruz-Orengo, L.; Pasioka, T. J.; Couraud, P.-O.; Romero, I. A.; Weksler, B. et al. (2013): Immortalized human cerebral microvascular endothelial cells maintain the properties of primary cells in an in vitro model of immune migration across the blood brain barrier. In *Journal of Neuroscience Methods* 212 (1), pp. 173–179. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2012.10.001.
- Defazio, G.; Ribatti, D.; Nico, B.; Ricchiuti, F.; Salvia, R. de; Roncali, L.; Livrea, P. (1997): Endocytosis of horseradish peroxidase by brain microvascular and umbilical vein endothelial cells in culture. An ultrastructural and morphometric study. In *Brain Research Bulletin* 43 (5), pp. 467–472. DOI: 10.1016/S0361-9230(97)00080-4.
- Deli, M. A.; Ábrahám, C. S.; Kataoka, Y.; Niwa, M. (2005): Permeability studies on in vitro blood–brain barrier models: Physiology, pathology, and pharmacology. In *Cell Mol Neurobiol* 25 (1), pp. 59–127. DOI: 10.1007/s10571-004-1377-8.
- DeMarco, V. G.; Li, N.; Thomas, J.; West, C. M.; Neu, J. (2003): Glutamine and barrier function in cultured Caco-2 epithelial cell monolayers. In *The Journal of nutrition* 133 (7), pp. 2176–2179. DOI: 10.1093/jn/133.7.2176.
- Demeuse, P.; Kerkhofs, A.; Struys-Ponsar, C.; Knoop, B.; Remacle, C.; van den Bosch de Aguilar, P. (2002): Compartmentalized coculture of rat brain endothelial cells and astrocytes. A syngenic model to study the blood-brain barrier. In *Journal of Neuroscience Methods* 121 (1), pp. 21–31. DOI: 10.1016/S0165-0270(02)00225-x.
- Deosarkar, S. P.; Prabhakarapandian, B.; Wang, B.; Sheffield, J. B.; Krynska, B.; Kiani, M. F. (2015): A novel dynamic neonatal blood-brain barrier on a chip. In *PLoS ONE* 10 (11), e0142725. DOI: 10.1371/journal.pone.0142725.
- DeStefano, J. G.; Xu, Z. S.; Williams, A. J.; Yimam, N.; Searson, P. C. (2017): Effect of shear stress on iPSC-derived human brain microvascular endothelial cells (dhBMECs). In *Fluids and barriers of the CNS* 14 (1), p. 20. DOI: 10.1186/s12987-017-0068-z.

- Di, L.; Kerns, E. H.; Fan, K.; McConnell, O. J.; Carter, G. T. (2003): High throughput artificial membrane permeability assay for blood–brain barrier. In *European Journal of Medicinal Chemistry* 38 (3), pp. 223–232. DOI: 10.1016/S0223-5234(03)00012-6.
- Dias, M. C.; Coisne, C.; Baden, P.; Enzmann, G.; Garrett, L.; Becker, L. et al. (2019): Claudin-12 is not required for blood–brain barrier tight junction function. In *Fluids and barriers of the CNS* 16 (1), p. 30.
- Dinner, S.; Borkowski, J.; Stump-Guthier, C.; Ishikawa, H.; Tenenbaum, T.; Schroten, H.; Schwerk, C. (2016): A choroid plexus epithelial cell-based model of the human blood–cerebrospinal fluid barrier to study bacterial infection from the basolateral side. In *Journal of visualized experiments* (111), e54061. DOI: 10.3791/54061.
- Distelmaier, F.; Huppke, P.; Pieperhoff, P.; Amunts, K.; Schaper, J.; Morava, E. et al. (2014): Biotin-responsive basal ganglia disease. A treatable differential diagnosis of leigh syndrome. In *JIMD reports* 13, pp. 53–57. DOI: 10.1007/8904_2013_271.
- Dohgu, S.; Takata, F.; Yamauchi, A.; Nakagawa, S.; Egawa, T.; Naito, M. et al. (2005): Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-beta production. In *Brain research* 1038 (2), pp. 208–215. DOI: 10.1016/j.brainres.2005.01.027.
- Doležal, R.; Karásková, N.; Musil, K.; Novák, M.; Maltsevskaya, N. V.; Maliňák, D. et al. (2018): Characterization of the penetration of the blood–brain barrier by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a stationary phase with an immobilized artificial membrane. In *Analytical Letters* 51 (15), pp. 2401–2414. DOI: 10.1080/00032719.2018.1424175.
- Domininghaus, Hans; Elsner, Peter; Eyerer, Peter; Hirth, Thomas (Eds.) (2012): *Kunststoffe. Eigenschaften und Anwendungen*. Springer. DOI: 10.1007/978-3-642-16173-5.
- Dorovini-Zis, K.; Prameya, R.; Bowman, P. D. (1991): Culture and characterization of microvascular endothelial cells derived from human brain. In *Laboratory investigation*; 64 (3), pp. 425–436.
- Dorovini-Zis, K.; Prameya, R.; Huynh, H. (2003): Isolation and characterization of human brain endothelial cells. In *Methods in molecular medicine* 89, pp. 325–336. DOI: 10.1385/1-59259-419-0:325.

- dos Santos, T.; Varela, J.; Lynch, I.; Salvati, A.; Dawson, K. A. (2011): Quantitative assessment of the comparative nanoparticle-uptake efficiency of a range of cell lines. In *Small* 7 (23), pp. 3341–3349. DOI: 10.1002/sml.201101076.
- Douville, N. J.; Tung, Y.-C.; Li, R.; Wang, J. D.; El-Sayed, M. E. H.; Takayama, S. (2010): Fabrication of two-layered channel system with embedded electrodes to measure resistance across epithelial and endothelial barriers. In *Analytical Chemistry* 82 (6), pp. 2505–2511. DOI: 10.1021/ac9029345.
- Eagle, H. (1971): Buffer combinations for mammalian cell culture. In *Science* 174 (4008), pp. 500–503. DOI: 10.1126/science.174.4008.500.
- Eagle, H. (1973): The effect of environmental pH on the growth of normal and malignant cells. In *Journal of Cellular Physiology* 82 (1), pp. 1–8. DOI: 10.1002/jcp.1040820102.
- Eigenmann, D. E.; Jähne, E. A.; Smieško, M.; Hamburger, M.; Oufir, M. (2016): Validation of an immortalized human (hBMEC) in vitro blood-brain barrier model. In *Anal Bioanal Chem* 408 (8), pp. 2095–2107. DOI: 10.1007/s00216-016-9313-6.
- Eigenmann, D. E.; Xue, G.; Kim, K. S.; Moses, A. V.; Hamburger, M.; Oufir, M. (2013): Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood-brain barrier model for drug permeability studies. In *Fluids and barriers of the CNS* 10 (1), pp. 1–17. DOI: 10.1186/2045-8118-10-33.
- Fanning, A. S.; Jameson, B. J.; Jesaitis, L. A.; Anderson, J. M. (1998): The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. In *The Journal of biological chemistry* 273 (45), pp. 29745–29753. DOI: 10.1074/jbc.273.45.29745.
- Farrell, C. R.; Stewart, P. A.; Farrell, C. L.; Del Maestro, R. F. (1987): Pericytes in human cerebral microvasculature. In *The Anatomical record* 218 (4), pp. 466–469. DOI: 10.1002/ar.1092180416.
- Fenstermacher, J.; Gross, P.; Sposito, N.; Acuff, V.; Pettersen, S.; Gruber, K. (1988): Structural and functional variations in capillary systems within the brain. In *Annals of the New York Academy of Sciences* 529, pp. 21–30. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1988.tb51416.x.
- Fitsanakis, V. A.; Piccola, G.; Aschner, J. L.; Aschner, M. (2005): Manganese transport by rat brain endothelial (RBE4) cell-based transwell model in the presence of astrocyte conditioned media. In *Journal of neuroscience research* 81 (2), pp. 235–243. DOI: 10.1002/jnr.20560.

- Förster, C.; Silwedel, C.; Golenhofen, N.; Burek, M.; Kietz, S.; Mankertz, J.; Drenckhahn, D. (2005): Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system. In *The Journal of Physiology* 565 (2), pp. 475–486. DOI: 10.1113/jphysiol.2005.084038.
- Förster, C. Y.; Burek, M.; Romero, I. A.; Weksler, B. B.; Couraud, P. O.; Drenckhahn, D. (2008): Differential effects of hydrocortisone and TNF α on tight junction proteins in an in vitro model of the human blood-brain barrier. In *Journal of Physiology* 586 (7), pp. 1937–1949. DOI: 10.1113/jphysiol.2007.146852.
- Frank, R. N.; Dutta, S.; Mancini, M. A. (1987): Pericyte coverage is greater in the retinal than in the cerebral capillaries of the rat. In *Investigative ophthalmology & visual science* 28 (7), pp. 1086–1091.
- Franke, H.; Galla, H.-J.; Beuckmann, C. T. (1999): An improved low-permeability in vitro-model of the blood–brain barrier. Transport studies on retinoids, sucrose, haloperidol, caffeine and mannitol. In *Brain research* 818 (1), pp. 65–71. DOI: 10.1016/S0006-8993(98)01282-7.
- Freshney, R. Ian (2010): Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. John Wiley & Sons
- Frey, A.; Meckelein, B.; Weiler-Güttler, H.; Möckel, B.; Flach, R.; Gassen, H. G. (1991): Pericytes of the brain microvasculature express gamma-glutamyl transpeptidase. In *European journal of biochemistry* 202 (2), pp. 421–429. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1991.tb16391.x.
- Fricker, G.; Ott, M.; Mahringer, A. (Eds.) (2014): The Blood Brain Barrier (BBB). Berlin, Heidelberg: Springer
- Fujimoto, K. (1995): Pericyte-endothelial gap junctions in developing rat cerebral capillaries. A fine structural study. In *The Anatomical record* 242 (4), pp. 562–565. DOI: 10.1002/ar.1092420412.
- Furihata, T.; Kawamatsu, S.; Ito, R.; Saito, K.; Suzuki, S.; Kishida, S. et al. (2015): Hydrocortisone enhances the barrier properties of HBMEC/ci β , a brain microvascular endothelial cell line, through mesenchymal-to-endothelial transition-like effects. In *Fluids and barriers of the CNS* 12, p. 7. DOI: 10.1186/s12987-015-0003-0.

- Furue, M. K.; Na, J.; Jackson, J. P.; Okamoto, T.; Jones, M.; Baker, D. et al. (2008): Heparin promotes the growth of human embryonic stem cells in a defined serum-free medium. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (36), pp. 13409–13414. DOI: 10.1073/pnas.0806136105.
- Furuse, M.; Fujimoto, K.; Sato, N.; Hirase, T.; Tsukita, S. (1996): Overexpression of occludin, a tight junction-associated integral membrane protein, induces the formation of intracellular multilamellar bodies bearing tight junction-like structures. In *Journal of Cell Science* 109 (2), pp. 429–435.
- Furuse, M.; Fujita, K.; Hiiragi, T.; Fujimoto, K.; Tsukita, S. (1998a): Claudin-1 and -2. Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. In *The Journal of Cell Biology* 141 (7), pp. 1539–1550. DOI: 10.1083/jcb.141.7.1539.
- Furuse, M.; Hirase, T.; Itoh, M.; Nagafuchi, A.; Yonemura, S.; Tsukita, S. (1993): Occludin. A novel integral membrane protein localizing at tight junctions. In *The Journal of Cell Biology* 123 (6 Pt 2), pp. 1777–1788. DOI: 10.1083/jcb.123.6.1777.
- Furuse, M.; Sasaki, H.; Fujimoto, K.; Tsukita, S. (1998b): A single gene product, claudin-1 or-2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. In *Journal of Cell Biology* 143 (2), pp. 391–401.
- Gaillard, P. J.; de Boer, A. G. (2000): Relationship between permeability status of the blood–brain barrier and in vitro permeability coefficient of a drug. In *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 12 (2), pp. 95–102. DOI: 10.1016/S0928-0987(00)00152-4.
- Gaillard, P. J.; Voorwinden, L. H.; Nielsen, J. L.; Ivanov, A.; Atsumi, R.; Engman, H. et al. (2001): Establishment and functional characterization of an in vitro model of the blood–brain barrier, comprising a co-culture of brain capillary endothelial cells and astrocytes. In *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 12 (3), pp. 215–222. DOI: 10.1016/S0928-0987(00)00123-8.
- Ganong, W. F. (2000): Circumventricular organs. Definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. In *Clinical and experimental pharmacology & physiology* 27 (5-6), pp. 422–427. DOI: 10.1046/j.1440-1681.2000.03259.x.
- Ganta, S.; Deshpande, D.; Korde, A.; Amiji, M. (2010): A review of multifunctional nanoemulsion systems to overcome oral and CNS drug delivery barriers. In *Molecular membrane biology* 27 (7), pp. 260–273. DOI: 10.3109/09687688.2010.497971.

- Gartzke, D.; Fricker, G. (2014): Establishment of optimized MDCK cell lines for reliable efflux transport studies. In *Journal of pharmaceutical sciences* 103 (4), pp. 1298–1304. DOI: 10.1002/jps.23901.
- Georgieva, J. V.; Hoekstra, D.; Zuhorn, I. S. (2014): Smuggling drugs into the brain. An overview of ligands targeting transcytosis for drug delivery across the blood-brain barrier. In *Pharmaceutics* 6 (4), pp. 557–583. DOI: 10.3390/pharmaceutics6040557.
- Gerhart, D. Z.; Broderius, M. A.; Drewes, L. R. (1988): Cultured human and canine endothelial cells from brain microvessels. In *Brain Research Bulletin* 21 (5), pp. 785–793. DOI: 10.1016/0361-9230(88)90047-0.
- Goldmann, E. E. (1913): Vitalfärbung am Zentralnervensystem. Beitr. zur Physio-Pathologie des Plexus chorioideus und der Hirnhäute: Reimer.
- Goldstein, G. W.; Betz, A. L. (1986): The blood-brain barrier. In *Scientific American* 255 (3), pp. 74–83. DOI: 10.1038/scientificamerican0986-74.
- Gray, B. L.; Lieu, D. K.; Collins, S. D.; Smith, R. L.; Barakat, A. I. (2002): Microchannel platform for the study of endothelial cell shape and function. In *Biomedical microdevices* 4 (1), pp. 9–16. DOI: 10.1023/A:1014211627166.
- Griep, L. M.; Wolbers, F.; Wagenaar, B. de; ter Braak, P. M.; Weksler, B. B.; Romero, I. A. et al. (2013): BBB on chip: microfluidic platform to mechanically and biochemically modulate blood-brain barrier function. In *Biomedical microdevices* 15 (1), pp. 145–150. DOI: 10.1007/s10544-012-9699-7.
- Grumetto, L.; Carpentiero, C.; Barbato, F. (2012): Lipophilic and electrostatic forces encoded in IAM-HPLC indexes of basic drugs. Their role in membrane partition and their relationships with BBB passage data. In *European journal of pharmaceutical sciences* 45 (5), pp. 685–692. DOI: 10.1016/j.ejps.2012.01.008.
- Günzel, D.; Yu, A. S. L. (2013): Claudins and the modulation of tight junction permeability. In *Physiological reviews* 93 (2), pp. 525–569. DOI: 10.1152/physrev.00019.2012.
- Hajal, C.; Campisi, M.; Mattu, C.; Chiono, V.; Kamm, R. D. (2018): In vitro models of molecular and nano-particle transport across the blood-brain barrier. In *Biomicrofluidics* 12 (4), p. 42213. DOI: 10.1063/1.5027118.
- Halldorsson, S.; Lucumi, E.; Gomez-Sjoberg, R.; Fleming, R. M. T. (2015): Advantages and challenges of microfluidic cell culture in polydimethylsiloxane devices. In *Biosensors & bioelectronics* 63, pp. 218–231. DOI: 10.1016/j.bios.2014.07.029.

- Hama, Y.; Shinohara, K. (1970): Electron spin resonance studies of polycarbonate irradiated by γ -rays and ultraviolet light. In *J. Polym. Sci. A-1 Polym. Chem.* 8 (3), pp. 651–663. DOI: 10.1002/pol.1970.150080308.
- Hartung, T. (2013): Look back in anger - what clinical studies tell us about preclinical work. In *Altex* 30 (3), pp. 275–291. DOI: 10.14573/altex.2013.3.275.
- Hartz, A. M. S.; Bauer, B. (2011): ABC transporters in the CNS - an inventory. In *Current Pharmaceutical Biotechnology* 12 (4), pp. 656–673. DOI: 10.2174/138920111795164020.
- Haseloff, R. F.; Dithmer, S.; Winkler, L.; Wolburg, H.; Blasig, I. E. (2015): Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects. In *Seminars in cell & developmental biology* 38, pp. 16–25. DOI: 10.1016/j.semcd.2014.11.004.
- Hatherell, K.; Couraud, P. O.; Romero, I. A.; Weksler, B. B.; Pilkington, G. J. (2011): Development of a three-dimensional, all-human in vitro model of the blood-brain barrier using mono-, co-, and tri-cultivation Transwell models. In *Journal of Neuroscience Methods* 199 (2), pp. 223–229. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2011.05.012.
- Hawkins, B. T.; Davis, T. P. (2005): The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. In *Pharmacological reviews* 57 (2), pp. 173–185. DOI: 10.1124/pr.57.2.4.
- Hawkins, B. T.; Egleton, R. D. (2008): Pathophysiology of the blood-brain barrier. Animal models and methods. In *Current topics in developmental biology*. 80, pp. 277–309. DOI: 10.1016/S0070-2153(07)80007-X.
- He, Y.; Yao, Y.; Tsirka, S. E.; Cao, Y. (2014): Cell-culture models of the blood-brain barrier. In *Stroke* (8), pp. 2514–2526. DOI: 10.1161/STROKEAHA.114.005427.
- Hellemans, J.; Mortier, G.; Paepe, A. de; Speleman, F.; Vandesompele, J. (2007): qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. In *Genome biology* 8 (2), R19. DOI: 10.1186/gb-2007-8-2-r19.
- Hellinger, E.; Veszelka, S.; Tóth, A. E.; Walter, F.; Kittel, A.; Bakk, M. L. et al. (2012): Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2, and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood-brain barrier penetration models. In *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics* 82 (2), pp. 340–351. DOI: 10.1016/j.ejpb.2012.07.020.

- Helms, H. C.; Abbott, N. J.; Burek, M.; Cecchelli, R.; Couraud, P.-O.; Deli, M. A. et al. (2016): In vitro models of the blood-brain barrier. An overview of commonly used brain endothelial cell culture models and guidelines for their use. In *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 36 (5), pp. 862–890. DOI: 10.1177/0271678X16630991.
- Hidalgo, I. J. (2001): Assessing the absorption of new pharmaceuticals. In *Current Topics in Medicinal Chemistry* 1 (5), pp. 385–401. DOI: 10.2174/1568026013395010.
- Hirase, T.; Staddon, J. M.; Saitou, M.; Ando-Akatsuka, Y.; Itoh, M.; Furuse, M. et al. (1997): Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. In *Journal of Cell Science* 110 (Pt 14), pp. 1603–1613.
- Hoheisel, D.; Nitz, T.; Franke, H.; Wegener, J.; Hakvoort, A.; Tilling, T.; Galla, H. J. (1998): Hydrocortisone reinforces the blood-brain barrier properties in a serum free cell culture system. In *Biochemical and biophysical research communications* 244 (1), pp. 312–316. DOI: 10.1006/bbrc.1997.8051.
- Holmlund, L. G. (1965): Steam corrosion and steam corrosion inhibition in autoclave sterilization of dental and surgical steel materials. In *Biotechnology and Bioengineering* 7 (1), pp. 177–198. DOI: 10.1002/bit.260070127.
- Hoshi, Y.; Uchida, Y.; Tachikawa, M.; Inoue, T.; Ohtsuki, S.; Terasaki, T. (2013): Quantitative atlas of blood-brain barrier transporters, receptors, and tight junction proteins in rats and common marmoset. In *Journal of pharmaceutical sciences* 102 (9), pp. 3343–3355. DOI: 10.1002/jps.23575.
- Hoshiba, T.; Yoshikawa, C.; Sakakibara, K. (2018): Characterization of initial cell adhesion on charged polymer substrates in serum-containing and serum-free media. In *Langmuir* 34 (13), pp. 4043–4051. DOI: 10.1021/acs.langmuir.8b00233.
- Huang, C.-W.; Lee, G.-B. (2007): A microfluidic system for automatic cell culture. In *Journal of Micromechanics and Microengineering* 17 (7), p. 1266. DOI: 10.1088/0960-1317/17/7/008
- Hughes, P.; Marshall, D.; Reid, Y.; Parkes, H.; Gelber, C. (2007): The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines. How much more data do we need? In *BioTechniques* 43 (5), 575, 577-8, 581-2 passim. DOI: 10.2144/000112598.
- Hung, P. J.; Lee, P. J.; Sabounchi, P.; Aghdam, N.; Lin, R.; Lee, L. P. (2005): A novel high aspect ratio microfluidic design to provide a stable and uniform microenvironment for cell growth in a high throughput mammalian cell culture array. In *Lab Chip* 5 (1), pp. 44–48. DOI: 10.1039/b410743h.

- Hur, S. S.; del Álamo, J. C.; Park, J. S.; Li, Y.-S.; Nguyen, H. A.; Teng, D. et al. (2012): Roles of cell confluency and fluid shear in 3-dimensional intracellular forces in endothelial cells. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (28), pp. 11110–11115. DOI: 10.1073/pnas.1207326109.
- Igarashi, Y.; Utsumi, H.; Chiba, H.; Yamada-Sasamori, Y.; Tobioka, H.; Kamimura, Y. et al. (1999): Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. In *Biochemical and biophysical research communications* 261 (1), pp. 108–112. DOI: 10.1006/bbrc.1999.0992.
- Itagaki, A.; Kimura, G. (1974): TES and HEPES buffers in mammalian cell cultures and viral studies. Problem of carbon dioxide requirement. In *Experimental Cell Research* 83 (2), pp. 351–361. DOI: 10.1016/0014-4827(74)90349-8.
- Izaki, K.; Matsubashi, M.; Strominger, J. L. (1966): Glycopeptide transpeptidase and D-alanine carboxypeptidase. Penicillin-sensitive enzymatic reactions. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 55 (3), pp. 656–663. DOI: 10.1073/pnas.55.3.656.
- Jiang, L.; Li, S.; Zheng, J.; Li, Y.; Huang, H. (2019): Recent progress in microfluidic models of the blood-brain barrier. In *Micromachines* 10 (6). DOI: 10.3390/mi10060375.
- Joó, F. (1985): The blood-brain barrier in vitro. Ten years of research on microvessels isolated from the brain. In *Neurochemistry international* 7 (1), pp. 1–25. DOI: 10.1016/0197-0186(85)90002-6.
- Kadurugamuwa, J. L.; Clarke, A. J.; Beveridge, T. J. (1993): Surface action of gentamicin on *Pseudomonas aeruginosa*. In *Journal of bacteriology* 175 (18), pp. 5798–5805. DOI: 10.1128/jb.175.18.5798-5805.1993.
- Kaisar, M. A.; Sajja, R. K.; Prasad, S.; Abhyankar, V. V.; Liles, T.; Cucullo, L. (2017): New experimental models of the blood-brain barrier for CNS drug discovery. In *Expert opinion on drug discovery* 12 (1), pp. 89–103. DOI: 10.1080/17460441.2017.1253676.
- Kansy, M.; Senner, F.; Gubernator, K. (1998): Physicochemical high throughput screening. Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. In *Journal of Medicinal Chemistry* 41 (7), pp. 1007–1010. DOI: 10.1021/jm970530e.

- Kara, A.; Ozturk, N.; Vural, I. (2017): In vitro CNS models. In *Nanotechnology Methods for Neurological Diseases and Brain Tumors. Drug Delivery across the Blood-Brain Barrier*. Elsevier Science, pp. 151–185. Academic Press. DOI: 10.1016/B978-0-12-803796-6.00008-3.
- Karande, P.; Trasatti, J. P.; Chandra, D. (2015): Novel approaches for the delivery of biologics to the central nervous system. In *Novel approaches and strategies for biologics, vaccines and cancer therapies*. pp. 59–88. Academic Press. DOI: 10.1016/b978-0-12-416603-5.00004-3.
- Katbab, A. A.; Burford, R. P.; Garnett, J. L. (1992): Radiation graft modification of EPDM rubber. In *International Journal of Radiation Applications and Instrumentation*. 39 (3), pp. 293–302. DOI: 10.1016/1359-0197(92)90156-A.
- Ketabi-Kiyanvash, N.; Herold-Mende, C.; Kashfi, F.; Caldeira, S.; Tommasino, M.; Haefeli, W. E.; Weiss, J. (2007): NKIM-6, a new immortalized human brain capillary endothelial cell line with conserved endothelial characteristics. In *Cell and tissue research* 328 (1), pp. 19–29. DOI: 10.1007/s00441-006-0348-4.
- Kim, J. A.; Kim, H. N.; Im, S.-K.; Chung, S.; Kang, J. Y.; Choi, N. (2015): Collagen-based brain microvasculature model in vitro using three-dimensional printed template. In *Biomicrofluidics* 9 (2), p. 24115. DOI: 10.1063/1.4917508.
- Kim, L.; Toh, Y.-C.; Voldman, J.; Yu, H. (2007): A practical guide to microfluidic perfusion culture of adherent mammalian cells. In *Lab on a chip* 7 (6), pp. 681–694. DOI: 10.1039/b704602b.
- Kiray, H.; Lindsay, S. L.; Hosseinzadeh, S.; Barnett, S. C. (2016): The multifaceted role of astrocytes in regulating myelination. In *Experimental Neurology* 283 (Pt B), pp. 541–549. DOI: 10.1016/j.expneurol.2016.03.009.
- Knedler, A.; Ham, R. G. (1987): Optimized medium for clonal growth of human microvascular endothelial cells with minimal serum. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 23 (7), pp. 481–491. DOI: 10.1007/BF02628418.
- Knichwitz, G. (2005): Der Säure-Basen-Haushalt. In *Intensivmedizin update* 1 (3), pp. 205–220. DOI: 10.1055/s-2005-870197.
- Kniesel, U.; Risau, W.; Wolburg, H. (1996): Development of blood-brain barrier tight junctions in the rat cortex. In *Developmental Brain Research* 96 (1-2), pp. 229–240. DOI: 10.1016/0165-3806(96)00117-4.

- Kola, I.; Landis, J. (2004): Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? In *Nature reviews. Drug discovery* 3 (8), pp. 711–715. DOI: 10.1038/nrd1470.
- Krause, G.; Winkler, L.; Mueller, S. L.; Haseloff, R. F.; Piontek, J.; Blasig, I. E. (2008): Structure and function of claudins. In *Biochimica et biophysica acta* 1778 (3), pp. 631–645. DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.10.018.
- Kretzmer, G.; Schügerl, K. (1991): Response of mammalian cells to shear stress. In *Applied Microbiology and Biotechnology* 34 (5), pp. 613–616. DOI: 10.1007/bf00167909.
- Kröll, S.; El-Gindi, J.; Thanabalasundaram, G.; Panpumthong, P.; Schrot, S.; Hartmann, C.; Galla, H.-J. (2009): Control of the blood-brain barrier by glucocorticoids and the cells of the neurovascular unit. In *Annals of the New York Academy of Sciences* 1165, pp. 228–239. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.04040.x.
- Kuo, Y.-C.; Lu, C.-H. (2011): Effect of human astrocytes on the characteristics of human brain-microvascular endothelial cells in the blood-brain barrier. In *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 86 (1), pp. 225–231. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2011.04.005.
- LeBleu, V. S.; Macdonald, B.; Kalluri, R. (2007): Structure and function of basement membranes. In *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)* 232 (9), pp. 1121–1129. DOI: 10.3181/0703-MR-72.
- Leclerc, E.; Sakai, Y.; Fujii, T. (2003): Cell culture in 3-Dimensional microfluidic structure of PDMS (polydimethylsiloxane). In *Biomedical microdevices* 5 (2), pp. 109–114. DOI: 10.1023/A:1024583026925.
- Lee, P. J.; Hung, P. J.; Rao, V. M.; Lee, L. P. (2006): Nanoliter scale microbioreactor array for quantitative cell biology. In *Biotechnology and Bioengineering* 94 (1), pp. 5–14. DOI: 10.1002/bit.20745.
- Lelong, I. H.; Rebel, G. (1998): pH drift of “physiological buffers” and culture media used for cell incubation during in vitro studies. In *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 39 (4), pp. 203–210. DOI: 10.1016/S1056-8719(98)00019-7.
- Lippmann, E. S.; Al-Ahmad, A.; Azarin, S. M.; Palecek, S. P.; Shusta, E. V. (2014): A retinoic acid-enhanced, multicellular human blood-brain barrier model derived from stem cell sources. In *Scientific reports* 4, p. 4160. DOI: 10.1038/srep04160.
- Lippmann, E. S.; Al-Ahmad, A.; Palecek, S. P.; Shusta, E. V. (2013): Modeling the blood-brain barrier using stem cell sources. In *Fluids and barriers of the CNS* 10 (1), p. 2. DOI: 10.1186/2045-8118-10-2.

- Lippmann, E. S.; Azarin, S. M.; Kay, J. E.; Nessler, R. A.; Wilson, H. K.; Al-Ahmad, A. et al. (2012): Derivation of blood-brain barrier endothelial cells from human pluripotent stem cells. In *Nature Biotechnology* 30 (8), pp. 783–791. DOI: 10.1038/nbt.2247.
- Lipschutz, J. H.; Li, S.; Arisco, A.; Balkovetz, D. F. (2005): Extracellular signal-regulated kinases 1/2 control claudin-2 expression in Madin-Darby canine kidney strain I and II cells. In *The Journal of biological chemistry* 280 (5), pp. 3780–3788. DOI: 10.1074/jbc.M408122200.
- Liu, W.; Wang, P.; Shang, C.; Chen, L.; Cai, H.; Ma, J. et al. (2014): Endophilin-1 regulates blood-brain barrier permeability by controlling ZO-1 and occludin expression via the EGFR-ERK1/2 pathway. In *Brain research* 1573, pp. 17–26. DOI: 10.1016/j.brainres.2014.05.022.
- Lönnroth, E. C. (2005): Toxicity of medical glove materials. A pilot study. In *International journal of occupational safety and ergonomics* 11 (2), pp. 131–139. DOI: 10.1080/10803548.2005.11076642.
- Lopez-Ramirez, M. A.; Male, D. K.; Wang, C.; Sharrack, B.; Wu, D.; Romero, I. A. (2013): Cytokine-induced changes in the gene expression profile of a human cerebral microvascular endothelial cell-line, hCMEC/D3. In *Fluids and barriers of the CNS* 10 (1), p. 27. DOI: 10.1186/2045-8118-10-27.
- Löscher, W.; Potschka, H. (2005): Blood-brain barrier active efflux transporters. ATP-binding cassette gene family. In *NeuroRx* 2 (1), pp. 86–98. DOI: 10.1602/neurorx.2.1.86.
- Luissint, A.-C.; Federici, C.; Guillonnet, F.; Chrétien, F.; Camoin, L.; Glacial, F. et al. (2012): Guanine nucleotide-binding protein Gαi2. A new partner of claudin-5 that regulates tight junction integrity in human brain endothelial cells. In *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 32 (5), pp. 860–873. DOI: 10.1038/jcbfm.2011.202.
- Luzzatto, L.; Apirion, D.; Schlessinger, D. (1968): Mechanism of action of streptomycin in *E. coli*. Interruption of the ribosome cycle at the initiation of protein synthesis. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 60 (3), pp. 873–880. DOI: 10.1073/pnas.60.3.873.
- Ma, S. H.; Lepak, L. A.; Hussain, R. J.; Shain, W.; Shuler, M. L. (2005): An endothelial and astrocyte co-culture model of the blood-brain barrier utilizing an ultra-thin, nanofabricated silicon nitride membrane. In *Lab Chip* 5 (1), pp. 74–85. DOI: 10.1039/b405713a.

- Macarak, E. J.; Howard, P. S. (1983): Adhesion of endothelial cells to extracellular matrix proteins. In *Journal of Cellular Physiology* 116 (1), pp. 76–86. DOI: 10.1002/jcp.1041160112.
- Mackenzie, C. G.; Mackenzie, J. B.; Beck, P. (1961): The effect of pH on growth, protein synthesis, and lipid-rich particles of cultured mammalian cells. In *The Journal of biophysical and biochemical cytology* 9, pp. 141–156. DOI: 10.1083/jcb.9.1.141.
- Maier, J. (2004): High concentrations of magnesium modulate vascular endothelial cell behaviour in vitro. In *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1689 (1), pp. 6–12. DOI: 10.1016/S0925-4439(04)00025-0.
- Major, E. O.; Miller, A. E.; Mourrain, P.; Traub, R. G.; de Widt, E.; Sever, J. (1985): Establishment of a line of human fetal glial cells that supports JC virus multiplication. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (4), pp. 1257–1261. DOI: 10.1073/pnas.82.4.1257.
- Mannino, R. G.; Myers, D. R.; Ahn, B.; Wang, Y.; Margo, R.; Gole, H. et al. (2015): "Do-it-yourself in vitro vasculature that recapitulates in vivo geometries for investigating endothelial-blood cell interactions". In *Scientific reports* 5, p. 12401. DOI: 10.1038/srep12401.
- Maoz, B. M.; Herland, A.; FitzGerald, E. A.; Grevesse, T.; Vidoudez, C.; Pacheco, A. R. et al. (2018): A linked organ-on-chip model of the human neurovascular unit reveals the metabolic coupling of endothelial and neuronal cells. In *Nature Biotechnology* 36 (9), pp. 865–874. DOI: 10.1038/nbt.4226.
- Mast, F.; Hoschitzky, J. A.; van Blitterswijk, C. A.; Huysmans, H. A. (1997): In vitro biocompatibility of EPM and EPDM rubbers. In *Journal of materials science. Materials in medicine* 8 (1), pp. 5–9. DOI: 10.1023/a:1018577910511
- Mathiisen, T. M.; Lehre, K. P.; Danbolt, N. C.; Ottersen, O. P. (2010): The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels. An electron microscopic 3D reconstruction. In *GLIA* 58 (9), pp. 1094–1103. DOI: 10.1002/glia.20990.
- Mattern, K.; Beißner, N.; Reichl, S.; Dietzel, A. (2018): DynaMiTES - A dynamic cell culture platform for in vitro drug testing PART 1 - Engineering of microfluidic system and technical simulations. In *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, 126, pp. 159-165 DOI: 10.1016/j.ejpb.2017.04.022.
- McQuaid, S.; Cunnea, P.; McMahon, J.; Fitzgerald, U. (2009): The effects of blood-brain barrier disruption on glial cell function in multiple sclerosis. In *Biochemical Society transactions* 37 (Pt 1), pp. 329–331. DOI: 10.1042/BST0370329.

- Melo, N. S. de; Pondé Weber, R.; Miguez Suarez, J. C. (2007): Toughness behavior of gamma-irradiated polycarbonate. In *Polymer Testing* 26 (3), pp. 315–322. DOI: 10.1016/j.polymertesting.2006.10.014.
- Méresse, S.; Dehouck, M. P.; Delorme, P.; Bensaïd, M.; Tauber, J. P.; Delbart, C. et al. (1989): Bovine brain endothelial cells express tight junctions and monoamine oxidase activity in long-term culture. In *J Neurochem* 53 (5), pp. 1363–1371. DOI: 10.1111/j.14714159.1989.tb08526.x.
- Miller, D. S.; Graeff, C.; Droulle, L.; Fricker, S.; Fricker, G. (2002): Xenobiotic efflux pumps in isolated fish brain capillaries. In *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 282 (1), R191-8. DOI: 10.1152/ajpregu.00305.2001.
- Mkrtchyan, H.; Scheler, S.; Klein, I.; Fahr, A.; Couraud, P. O.; Romero, I. A. et al. (2009): Molecular cytogenetic characterization of the human cerebral microvessel endothelial cell line hCMEC/D3. In *Cytogenetic and genome research* 126 (4), pp. 313–317. DOI: 10.1159/000253080.
- Morshed, K. M.; McMartin, K. E. (1995): Transient alterations in cellular permeability in cultured human proximal tubule cells. Implications for transport studies. In *In vitro cellular & developmental biology. Animal* 31 (2), pp. 107–114. DOI: 10.1007/BF02633970.
- Mucsi, Z.; Chass, G. A.; Ábrányi-Balogh, P.; Jójárt, B.; Fang, D.-C.; Ramirez-Cuesta, A. J. et al. (2013): Penicillin's catalytic mechanism revealed by inelastic neutrons and quantum chemical theory. In *Physical chemistry chemical physics : PCCP* 15 (47), pp. 20447–20455. DOI: 10.1039/c3cp50868d.
- Müller, H.-J. (2016): PCR - Polymerase-Kettenreaktion. Springer Berlin Heidelberg.
- Müller, J.; Esső, K.; Dargó, G.; Könczöl, Á.; Balogh, G. T. (2015): Tuning the predictive capacity of the PAMPA-BBB model. In *European journal of pharmaceutical sciences* 79, pp. 53–60. DOI: 10.1016/j.ejps.2015.08.019.
- Nagelhus, E. A.; Mathiisen, T. M.; Ottersen, O. P. (2004): Aquaporin-4 in the central nervous system. Cellular and subcellular distribution and coexpression with KIR4.1. In *Neuroscience* 129 (4), pp. 905–913. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2004.08.053.
- Nakagawa, S.; Deli, M. A.; Kawaguchi, H.; Shimizudani, T.; Shimono, T.; Kittel, A. et al. (2009): A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. In *Neurochemistry international* 54 (3-4), pp. 253–263. DOI: 10.1016/j.neu.int.2008.12.002.

- Nakagawa, S.; Deli, M. A.; Nakao, S.; Honda, M.; Hayashi, K.; Nakaoke, R. et al. (2007): Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. In *Cell Mol Neurobiol* 27 (6), pp. 687–694. DOI: 10.1007/s10571-007-9195-4.
- Nicolas, J.-M. (2015): Species differences and impact of disease state on BBB. In *Blood-brain barrier in drug discovery. Optimizing brain exposure of CNS drugs and minimizing brain side effects for peripheral drugs*. Hoboken, N. J.: John Wiley & Sons Ltd., pp. 66–93.
- Nielsen, S. S. E.; Siupka, P.; Georgian, A.; Preston, J. E.; Tóth, A. E.; Yusof, S. R. et al. (2017): Improved method for the establishment of an in vitro blood-brain barrier model based on porcine brain endothelial cells. In *Journal of visualized experiments* (127). e56277. DOI: 10.3791/56277.
- Nitta, T.; Hata, M.; Gotoh, S.; Seo, Y.; Sasaki, H.; Hashimoto, N. et al. (2003): Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. In *The Journal of Cell Biology* 161 (3), pp. 653–660. DOI: 10.1083/jcb.200302070.
- Nitz, T.; Eisenblätter, T.; Psathaki, K.; Galla, H.-J. (2003): Serum-derived factors weaken the barrier properties of cultured porcine brain capillary endothelial cells in vitro. In *Brain research* 981 (1-2), pp. 30–40.
- Noria, S.; Xu, F.; McCue, S.; Jones, M.; Gotlieb, A. I.; Langille, B. L. (2004): Assembly and reorientation of stress fibers drives morphological changes to endothelial cells exposed to shear stress. In *American Journal of Pathology* 164 (4), pp. 1211–1223. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63209-9.
- Nukaya, D.; Minami, K.; Hoshikawa, R.; Yokoi, N.; Seino, S. (2015): Preferential gene expression and epigenetic memory of induced pluripotent stem cells derived from mouse pancreas. In *Genes to cells* 20 (5), pp. 367–381. DOI: 10.1111/gtc.12227.
- Oddo, A.; Peng, B.; Tong, Z.; Wei, Y.; Tong, W. Y.; Thissen, H.; Voelcker, N. H. (2019): Advances in microfluidic blood–brain barrier (BBB) models. In *Trends in Biotechnology*. DOI: 10.1016/j.tibtech.2019.04.006.
- Ohtsuki, S.; Ikeda, C.; Uchida, Y.; Sakamoto, Y.; Miller, F.; Glacial, F. et al. (2013): Quantitative targeted absolute proteomic analysis of transporters, receptors and junction proteins for validation of human cerebral microvascular endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model. In *Molecular pharmaceutics* 10 (1), pp. 289–296. DOI: 10.1021/mp3004308.

- Ohtsuki, S.; Sato, S.; Yamaguchi, H.; Kamoi, M.; Asashima, T.; Terasaki, T. (2007): Exogenous expression of claudin-5 induces barrier properties in cultured rat brain capillary endothelial cells. In *Journal of Cellular Physiology* 210 (1), pp. 81–86. DOI: 10.1002/jcp.20823.
- Ohtsuki, S.; Yamaguchi, H.; Katsukura, Y.; Asashima, T.; Terasaki, T. (2008): mRNA expression levels of tight junction protein genes in mouse brain capillary endothelial cells highly purified by magnetic cell sorting. In *Journal of neurochemistry* 104 (1), pp. 147–154. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.05008.x.
- Oishi, K.; Kamiyashiki, T.; Ito, Y. (2007): Isometric contraction of microvascular pericytes from mouse brain parenchyma. In *Microvascular Research* 73 (1), pp. 20–28. DOI: 10.1016/j.mvr.2006.08.004.
- Oldendorf, W. H. (1973): Carrier-mediated blood-brain barrier transport of short-chain monocarboxylic organic acids. In *The American journal of physiology* 224 (6), pp. 1450–1453. DOI: 10.1152/ajplegacy.1973.224.6.1450.
- Oldendorf, W. H.; Brown, W. J. (1975): Greater number of capillary endothelial cell mitochondria in brain than in muscle. In *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 149 (3), pp. 736–738. DOI: 10.3181/00379727-149-38889.
- Oldendorf, W. H.; Cornford, M. E.; Brown, W. J. (1977): The large apparent work capability of the blood-brain barrier. A study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat. In *Annals of neurology* 1 (5), pp. 409–417. DOI: 10.1002/ana.410010502.
- Olesen, S. P. (1985): Electrical resistance of arterioles and venules in the hamster cheek pouch. In *Acta physiologica Scandinavica* 123 (1), pp. 121–126. DOI: 10.1111/j.1748-1716.1985.tb07568.x.
- Olesen, S. P.; Crone, C. (1983): Electrical resistance of muscle capillary endothelium. In *Biophysical Journal* 42 (1), pp. 31–41. DOI: 10.1016/S0006-3495(83)84366-5.
- Paguirigan, A. L.; Beebe, D. J. (2009): From the cellular perspective. Exploring differences in the cellular baseline in macroscale and microfluidic cultures. In *Integrative biology* 1 (2), pp. 182–195. DOI: 10.1039/b814565b.
- Pahnke, J.; Langer, O.; Krohn, M. (2014): Alzheimer's and ABC transporters—new opportunities for diagnostics and treatment. In *Neurobiology of disease* 72, pp. 54–60. DOI: 10.1016/j.nbd.2014.04.001

- Panula, P.; Joó, F.; Rechartt, L. (1978): Evidence for the presence of viable endothelial cells in cultures derived from dissociated rat brain. In *Experientia* 34 (1), pp. 95–97. DOI: 10.1007/bf01921925.
- Papadopoulos, M. C.; Saadoun, S.; Woodrow, C. J.; Davies, D. C.; Costa-Martins, P.; Moss, R. F. et al. (2001): Occludin expression in microvessels of neoplastic and non-neoplastic human brain. In *Neuropathology and applied neurobiology* 27 (5), pp. 384–395. DOI: 10.1046/j.0305-1846.2001.00341.x.
- Pardridge, W. M. (1995): Transport of small molecules through the blood-brain barrier. Biology and methodology. In *Advanced Drug Delivery Reviews* 15 (1-3), pp. 5–36. DOI: 10.1016/0169-409x(95)00003-p
- Pardridge, W. M. (2003): Blood-brain barrier drug targeting. The future of brain drug development. In *Molecular interventions* 3 (2), 90-105, 51. DOI: 10.1124/mi.3.2.90.
- Pardridge, W. M. (2005): The blood-brain barrier. Bottleneck in brain drug development. In *NeuroRx* 2 (1), pp. 3–14. DOI: 10.1602/neurorx.2.1.3.
- Pardridge, W. M. (2012): Drug transport across the blood-brain barrier. In *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 32 (11), pp. 1959–1972. DOI: 10.1038/jcbfm.2012.126.
- Pardridge, W. M. (2016): CSF, blood-brain barrier, and brain drug delivery. In *Expert Opinion on Drug Delivery* 13 (7), pp. 963–975. DOI: 10.1517/17425247.2016.1171315.
- Pardridge, W. M.; Boado, R. J.; Farrell, C. R. (1990): Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. In *The Journal of biological chemistry* 265 (29), pp. 18035–18040.
- Pardridge, W. M.; Oldendorf, W. H. (1975): Kinetic analysis of blood-brain barrier transport of amino acids. In *Biochimica et Biophysica Acta* 401 (1), pp. 128–136. DOI: 10.1016/0005-2736(75)90347-8.
- Partyka, P. P.; Godsey, G. A.; Galie, J. R.; Kosciuk, M. C.; Acharya, N. K.; Nagele, R. G.; Galie, P. A. (2017): Mechanical stress regulates transport in a compliant 3D model of the blood-brain barrier. In *Biomaterials* 115, pp. 30–39. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2016.11.012.
- Patabendige, A.; Skinner, R. A.; Abbott, N. J. (2013a): Establishment of a simplified in vitro porcine blood-brain barrier model with high transendothelial electrical resistance. In *Brain research* 1521, pp. 1–15. DOI: 10.1016/j.brainres.2012.06.057.

- Patabendige, A.; Skinner, R. A.; Morgan, L.; Abbott, N. J. (2013b): A detailed method for preparation of a functional and flexible blood-brain barrier model using porcine brain endothelial cells. In *Brain research* 1521, pp. 16–30. DOI: 10.1016/j.brainres.2013.04.006.
- Perrin, S. (2014): Preclinical research. Make mouse studies work. In *Nature* 507 (7493), pp. 423–425. DOI: 10.1038/507423a.
- Pidgeon, C.; Ong, S.; Liu, H.; Qiu, X.; Pidgeon, M.; Dantzig, A. H. et al. (1995): IAM chromatography. An in vitro screen for predicting drug membrane permeability. In *Journal of Medicinal Chemistry* 38 (4), pp. 590–594. DOI: 10.1021/jm00004a004.
- Poller, B.; Drewe, J.; Krähenbühl, S.; Huwyler, J.; Gutmann, H. (2010): Regulation of BCRP (ABCG2) and P-glycoprotein (ABCB1) by cytokines in a model of the human blood-brain barrier. In *Cell Mol Neurobiol* 30 (1), pp. 63–70. DOI: 10.1007/s10571-009-9431-1.
- Poller, B.; Gutmann, H.; Krähenbühl, S.; Weksler, B.; Romero, I.; Couraud, P. O. et al. (2008): The human brain endothelial cell line hCMEC/D3 as a human blood-brain barrier model for drug transport studies. In *Journal of neurochemistry* 107 (5), pp. 1358–1368. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05730.x
- Poole, C. A.; Reilly, H. C.; Flint, M. H. (1982): The adverse effects of HEPES, TES, and BES zwitterion buffers on the ultrastructure of cultured chick embryo epiphyseal chondrocytes. In *In Vitro* 18 (9), pp. 755–765. DOI: 10.1007/bf02796499.
- Prabhakarandian, B.; Shen, M. C.; Nichols, J. B.; Mills, I. R.; Sidoryk- Wegrzynowicz M.; Aschner, M. et al. (2013): SyM-BBB. A microfluidic blood brain barrier model. In *Lab on a chip* 13 (6), pp. 1093–1101. DOI: 10.1039/c2lc41208j.
- Prakash, M.; Gershenfeld, N. (2007): Microfluidic bubble logic. In *Science* 315 (5813), pp. 832–835. DOI: 10.1126/science.1136907.
- Prudhomme, J. G.; Sherman, I. W.; Land, K. M.; Moses, A. V.; Stenglein, S.; Nelson, J. A. (1996): Studies of plasmodium falciparum cytoadherence using immortalized human brain capillary endothelial cells. In *International journal for parasitology* 26 (6), pp. 647–655.
- Rach, J.; Halter, B.; Aufderheide, M. (2013): Importance of material evaluation prior to the construction of devices for in vitro techniques. In *Experimental and toxicologic pathology* 65 (7-8), pp. 973–978. DOI: 10.1016/j.etp.2013.01.011.

- Ragnaill, M. N.; Brown, M.; Ye, D.; Bramini, M.; Callanan, S.; Lynch, I.; Dawson, K. A. (2011): Internal benchmarking of a human blood–brain barrier cell model for screening of nanoparticle uptake and transcytosis. In *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 77 (3), pp. 360–367. DOI: 10.1016/j.ejpb.2010.12.024
- Rahman, N. A.; Rasil, A. N.'a. H. M.; Meyding-Lamade, U.; Craemer, E. M.; Diah, S.; Tuah, A. A.; Muharram, S. H. (2016): Immortalized endothelial cell lines for in vitro blood-brain barrier models: A systematic review. In *Brain research* 1642, pp. 532–545. DOI: 10.1016/j.brainres.2016.04.024.
- Reese, T. S. (1967): Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. In *The Journal of Cell Biology* 34 (1), pp. 207–217. DOI: 10.1083/jcb.34.1.207.
- Reinitz, A.; DeStefano, J.; Ye, M.; Wong, A. D.; Searson, P. C. (2015): Human brain microvascular endothelial cells resist elongation due to shear stress. In *Microvascular Research* 99, pp. 8–18. DOI: 10.1016/j.mvr.2015.02.008.
- Rochfort, K. D.; Cummins, P. M. (2019): In vitro cell models of the human blood-brain barrier: Demonstrating the beneficial influence of shear stress on brain microvascular endothelial cell phenotype. In *Blood-Brain Barrier*, Springer, pp. 71–98.
- Rogers, W. J. (2013): The effects of sterilization on medical materials and welded devices. In *Joining and assembly of medical materials and devices*. Woodhead Publishing, pp. 79–130. DOI: 10.1533/9780857096425.1.79.
- Roux, F. S.; Couraud, P. O. (2005): Rat brain endothelial cell lines for the study of blood-brain barrier permeability and transport functions. In *Cell Mol Neurobiol* 25 (1), pp. 41–58. DOI: 10.1007/s10571-004-1376-9.
- Rubin, L. L.; Hall, D. E.; Porter, S.; Barbu, K.; Cannon, C.; Horner, H. C. et al. (1991): A cell culture model of the blood-brain barrier. In *The Journal of Cell Biology* 115 (6), pp. 1725–1735. DOI: 10.1083/jcb.115.6.1725.
- Rucker, H. K.; Wynder, H. J.; Thomas, W.E. (2000): Cellular mechanisms of CNS pericytes. In *Brain Research Bulletin* 51 (5), pp. 363–369. DOI: 10.1016/S0361-9230(99)00260-9.
- Rudin, A.; Healey, A.; Phillips, C. A.; Gump, D. W.; Forsyth, B. R. (1970): Antibacterial activity of gentamicin sulfate in tissue culture. In *Applied microbiology* 20 (6), pp. 989–990.
- Rutten, M. J.; Hoover, R. L.; Karnovsky, M. J. (1987): Electrical resistance and macromolecular permeability of brain endothelial monolayer cultures. In *Brain research* 425 (2), pp. 301–310. DOI: 10.1016/0006-8993(87)90513-0.

- Ryu, A. H.; Eckalbar, W. L.; Kreimer, A.; Yosef, N.; Ahituv, N. (2017): Use antibiotics in cell culture with caution. Genome-wide identification of antibiotic-induced changes in gene expression and regulation. In *Scientific reports* 7 (1), p. 7533. DOI: 10.1038/s41598-017-07757-w.
- Saitou, M.; Fujimoto, K.; Doi, Y.; Itoh, M.; Fujimoto, T.; Furuse, M. et al. (1998): Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. In *The Journal of Cell Biology* 141 (2), pp. 397–408. DOI: 10.1083/jcb.141.2.397
- Saitou, M.; Furuse, M.; Sasaki, H.; Schulzke, J. D.; Fromm, M.; Takano, H. et al. (2000): Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. In *Molecular biology of the cell* 11 (12), pp. 4131–4142. DOI: 10.1091/mbc.11.12.4131.
- Sajja, R. K.; Prasad, S.; Cucullo, L. (2014): Impact of altered glycaemia on blood-brain barrier endothelium. An in vitro study using the hCMEC/D3 cell line. In *Fluids and barriers of the CNS* 11 (1), p. 8. DOI: 10.1186/2045-8118-11-8.
- Sano, Y.; Shimizu, F.; Abe, M.; Maeda, T.; Kashiwamura, Y.; Ohtsuki, S. et al. (2010): Establishment of a new conditionally immortalized human brain microvascular endothelial cell line retaining an in vivo blood-brain barrier function. In *Journal of Cellular Physiology* 225 (2), pp. 519–528. DOI: 10.1002/jcp.22232.
- Sastri, V. R. (Ed.) (2014): *Plastics in medical devices. Properties, requirements, and applications.* Elsevier/William Andrew.
- Saunders, N. R.; Dreifuss, J.-J.; Dziegielewska, K. M.; Johansson, P. A.; Habgood, M. D.; Møllgård, K.; Bauer, H.-C. (2014): The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies. A walk through 100 years of history. In *Frontiers in neuroscience* 8, p. 404. DOI: 10.3389/fnins.2014.00404.
- Schrade, A.; Sade, H.; Couraud, P. O.; Romero, I. A.; Weksler, B. B.; Niewoehner, J. (2012): Expression and localization of claudins-3 and -12 in transformed human brain endothelium. In *Fluids and barriers of the CNS* 9 (1). DOI: 10.1186/2045-8118-9-6.
- Schulze, C.; Firth, J. A. (1993): Immunohistochemical localization of adherens junction components in blood-brain barrier microvessels of the rat. In *Journal of Cell Science* 104 (Pt 3), pp. 773–782.
- Schumacher, K.; Strehl, R.; Vries, U. de; Minuth, W. W. (2002): Advanced technique for long term culture of epithelia in a continuous luminal-basal medium gradient. In *Biomaterials* 23 (3), pp. 805–815. DOI: 10.1016/S0142-9612(01)00186-7.

- Sellgren, K. L.; Hawkins, B. T.; Grego, S. (2015): An optically transparent membrane supports shear stress studies in a three-dimensional microfluidic neurovascular unit model. In *Biomicrofluidics* 9 (6), p. 61102. DOI: 10.1063/1.4935594.
- Sharma, D.; Cukras, A. R.; Rogers, E. J.; Southworth, D. R.; Green, R. (2007): Mutational analysis of S12 protein and implications for the accuracy of decoding by the ribosome. In *Journal of molecular biology* 374 (4), pp. 1065–1076. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.10.003.
- Shayan, G.; Choi, Y. S.; Shusta, E. V.; Shuler, M. L.; Lee, K. H. (2011): Murine in vitro model of the blood–brain barrier for evaluating drug transport. In *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 42 (1-2), pp. 148–155.
- Sheller, R. A.; Cuevas, M. E.; Todd, M. C. (2017): Comparison of transepithelial resistance measurement techniques. Chopsticks vs. Endohm. In *Biological procedures online* 19, p. 4. DOI: 10.1186/s12575-017-0053-6.
- Shimizu, F.; Sano, Y.; Maeda, T.; Abe, M.-A.; Nakayama, H.; Takahashi, R.-I. et al. (2008): Peripheral nerve pericytes originating from the blood-nerve barrier expresses tight junctional molecules and transporters as barrier-forming cells. In *Journal of Cellular Physiology* 217 (2), pp. 388–399. DOI: 10.1002/jcp.21508.
- Siddharthan, V.; Kim, Y. V.; Liu, S.; Kim, K. S. (2007): Human astrocytes/astrocyte-conditioned medium and shear stress enhance the barrier properties of human brain microvascular endothelial cells. In *Brain research* 1147, pp. 39–50. DOI: 10.1016/j.brainres.2007.02.029.
- Simonas, K.; Virta, H. (2006): Growing Madin-Darby canine kidney cells for studying epithelial cell biology. In *Cell biology. A laboratory handbook*, Elsevier, pp. 101–106. DOI: 10.1016/B978-012164730-8/50016-2.
- Sivandzade, F.; Cucullo, L. (2018): In-vitro blood-brain barrier modeling. A review of modern and fast-advancing technologies. In *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 38 (10), pp. 1667–1681. DOI: 10.1177/0271678X18788769.
- Smith, E. J.; Staton, C. A. (2006): Tubule formation assays. In *Angiogenesis assays. A critical appraisal of current techniques*. J. Wiley & Sons, pp. 65–87. DOI: 10.1002/9780470029350.ch4.
- Smith, Q. R.; Rapoport, S. I. (1986): Cerebrovascular permeability coefficients to sodium, potassium, and chloride. In *J Neurochem* 46 (6), pp. 1732–1742.

- Sobue, K.; Yamamoto, N.; Yoneda, K.; Hodgson, M. E.; Yamashiro, K.; Tsuruoka, N. et al. (1999): Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors. In *Neuroscience Research* 35 (2), pp. 155–164. DOI: 10.1016/S0168-0102(99)00079-6.
- Sreekanthreddy, P.; Gromnicova, R.; Davies, H.; Phillips, J.; Romero, I. A.; Male, D. (2015): A three-dimensional model of the human blood-brain barrier to analyse the transport of nanoparticles and astrocyte/endothelial interactions. In *F1000Research* 4, p. 1279. DOI: 10.12688/f1000research.7142.2.
- Stanimirovic, D. B.; Friedman, A. (2012): Pathophysiology of the neurovascular unit. Disease cause or consequence? In *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 32 (7), pp. 1207–1221. DOI: 10.1038/jcbfm.2012.25.
- Stanley, A. J.; Banks, R. E.; Southgate, J.; Selby, P. J. (1995): Effect of cell density on the expression of adhesion molecules and modulation by cytokines. In *Cytometry* 21 (4), pp. 338–343. DOI: 10.1002/cyto.990210405.
- Stephan Reichl (2003): Entwicklung porciner und humaner organotypischer cornealer Zellkulturmodelle für in vitro Permeationsuntersuchungen. Dissertation. Technischen Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig. Institut für pharmazeutische Technologie.
- Stevenson, B. R.; Siliciano, J. D.; Mooseker, M. S.; Goodenough, D. A. (1986): Identification of ZO-1. A high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. In *The Journal of Cell Biology* 103 (3), pp. 755–766. DOI: 10.1083/jcb.103.3.755.
- Stewart, P. A.; Wiley, M. J. (1981a): Developing nervous tissue induces formation of blood-brain barrier characteristics in invading endothelial cells. A study using quail-chick transplantation chimeras. In *Developmental Biology* 84 (1), pp. 183–192. DOI: 10.1016/0012-1606(81)90382-1.
- Stewart, P. A.; Wiley, M. J. (1981b): Structural and histochemical features of the avian blood-brain barrier. In *The Journal of comparative neurology* 202 (2), pp. 157–167. DOI: 10.1002/cne.902020203.
- Stins, M. F.; Badger, J.; Sik Kim, K. (2001): Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells. In *Microbial pathogenesis* 30 (1), pp. 19–28. DOI: 10.1006/mpat.2000.0406.

- Storck, S. E.; Pietrzik, C. U. (2018): Die Blut-Hirn-Schranke und ihre Rolle in der Alzheimer – Krankheit. In *Neuroforum* 24 (4), pp. 287–296. DOI: 10.1515/nf-2018-0014.
- Strazza, M.; Maubert, M. E.; Pirrone, V.; Wigdahl, B.; Nonnemacher, M. R. (2016): Co-culture model consisting of human brain microvascular endothelial and peripheral blood mononuclear cells. In *Journal of Neuroscience Methods* 269, pp. 39–45. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2016.05.016.
- Sung, J. H.; Shuler, M. L. (2009): A micro cell culture analog (microCCA) with 3-D hydrogel culture of multiple cell lines to assess metabolism-dependent cytotoxicity of anti-cancer drugs. In *Lab Chip* 9 (10), pp. 1385–1394. DOI: 10.1039/b901377f.
- Sussman, I.; Carson, M. P.; McCall, A. L.; Schultz, V.; Ruderman, N. B.; Tornheim, K. (1988): Energy state of bovine cerebral microvessels. Comparison of isolation methods. In *Microvascular Research* 35 (2), pp. 167–178. DOI: 10.1016/0026-2862(88)90060-X.
- Suwannaphan, T.; Pimpin, A.; Srituravanich, W.; Jeamsaksiri, W.; Sripumkhai, W.; Ketpun, D. et al. (2015): Investigation of shear stress and cell survival in a microfluidic chip for a single cell study. In 2015 8th Biomedical Engineering International Conference (BMEiCON) IEEE, pp. 1–5.
- Taddei, A.; Giampietro, C.; Conti, A.; Orsenigo, F.; Breviario, F.; Pirazzoli, V. et al. (2008): Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. In *Nature Cell Biology* 10 (8), pp. 923–934. DOI: 10.1038/ncb1752.
- Tai, L. M.; Reddy, P. S.; Lopez-Ramirez, M. A.; Davies, H. A.; Male, D. K.; Male, A David K et al. (2009): Polarized P-glycoprotein expression by the immortalised human brain endothelial cell line, hCMEC/D3, restricts apical-to-basolateral permeability to rhodamine 123. In *Brain research* 1292, pp. 14–24. DOI: 10.1016/j.brainres.2009.07.039.
- Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. (2007): Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. In *Cell* 131 (5), pp. 861–872. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- Tarbell, J. M. (2010): Shear stress and the endothelial transport barrier. In *Cardiovascular research* 87 (2), pp. 320–330. DOI: 10.1093/cvr/cvq146.
- Tell, D. von; Armulik, A.; Betsholtz, C. (2006): Pericytes and vascular stability. In *Experimental Cell Research* 312 (5), pp. 623–629. DOI: 10.1016/j.yexcr.2005.10.019.

- Terrell-Hall, T. B.; Ammer, A. G.; Griffith, J. I. G.; Lockman, P. R. (2017): Permeability across a novel microfluidic blood-tumor barrier model. In *Fluids and barriers of the CNS* 14 (1), p. 3. DOI: 10.1186/s12987-017-0050-9.
- Thanabalasundaram, G.; Pieper, C.; Lischper, M.; Galla, H.-J. (2010): Regulation of the blood-brain barrier integrity by pericytes via matrix metalloproteinases mediated activation of vascular endothelial growth factor in vitro. In *Brain research* 1347, pp. 1–10. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.05.096.
- Thomsen, L. B.; Burkhart, A.; Moos, T. (2015): A triple culture model of the blood-brain barrier using porcine brain endothelial cells, astrocytes and pericytes. In *PLoS ONE* 10 (8), e0134765. DOI: 10.1371/journal.pone.0134765.
- Thomson, J. A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S. S.; Waknitz, M. A.; Swiergiel, J. J.; Marshall, V. S.; Jones, J. M. (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. In *Science (New York, N.Y.)* 282 (5391), pp. 1145–1147. DOI: 10.1126/science.282.5391.1145.
- Tibbe, M. P.; Leferink, A. M.; van den Berg, Albert; Eijkel, J. C. T.; Segerink, L. I. (2018): Microfluidic gel patterning method by use of a temporary membrane for organ-on-chip applications. In *Adv. Mater. Technol.* 3 (3), p. 1700200. DOI: 10.1002/admt.201700200.
- Tietz, S.; Engelhardt, B. (2015): Brain barriers. Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. In *The Journal of Cell Biology* 209 (4), pp. 493–506. DOI: 10.1083/jcb.201412147.
- Tilling, T.; Engelbertz, C.; Decker, S.; Korte, D.; Hüwel, S.; Galla, H.-J. (2002): Expression and adhesive properties of basement membrane proteins in cerebral capillary endothelial cell cultures. In *Cell and tissue research* 310 (1), pp. 19–29. DOI: 10.1007/s00441-002-0604-1.
- Tilling, T.; Korte, D.; Hoheisel, D.; Galla, H.-J. (1998): Basement membrane proteins influence brain capillary endothelial barrier function in vitro. In *Journal of neurochemistry* 71 (3), pp. 1151–1157. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1998.71031151.x.
- Toepke, M. W.; Beebe, D. J. (2006): PDMS absorption of small molecules and consequences in microfluidic applications. In *Lab Chip* 6 (12), pp. 1484–1486. DOI: 10.1039/b612140c.
- Toh, Y.-C.; Zhang, C.; Zhang, J.; Khong, Y. M.; Chang, S.; Samper, V. D. et al. (2007): A novel 3D mammalian cell perfusion-culture system in microfluidic channels. In *Lab Chip* 7 (3), pp. 302–309. DOI: 10.1039/b614872g.

- Tornavaca, O.; Chia, M.; Dufton, N.; Almagro, L. O.; Conway, D. E.; Randi, A. M. et al. (2015): ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. In *The Journal of Cell Biology* 208 (6), pp. 821–838. DOI: 10.1083/jcb.201404140.
- Toyoda, K.; Tanaka, K.; Nakagawa, S.; Thuy, D. H. D.; Ujifuku, K.; Kamada, K. et al. (2013): Initial contact of glioblastoma cells with existing normal brain endothelial cells strengthen the barrier function via fibroblast growth factor 2 secretion. A new in vitro blood–brain barrier model. In *Cell Mol Neurobiol* 33 (4), pp. 489–501.
- Traub, O.; Berk, B. C. (1998): Laminar shear stress. Mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. In *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 18 (5), pp. 677–685. DOI: 10.1161/01.atv.18.5.677.
- Urich, E.; Lazic, S. E.; Molnos, J.; Wells, I. S.; Freskgård, P. O. (2012): Transcriptional profiling of human brain endothelial cells reveals key properties crucial for predictive in vitro blood-brain barrier models. In *PLoS ONE* 7 (5). DOI: 10.1371/journal.pone.0038149.
- van der Helm, M. W.; Odijk, M.; Frimat, J.-P.; Van Der Meer, A. D.; Eijkel, J. C. T.; van den Berg, Albert; Segerink, L. I. (2016a): Direct quantification of transendothelial electrical resistance in organs-on-chips. In *Biosensors & bioelectronics* 85, pp. 924–929. DOI: 10.1016/j.bios.2016.06.014.
- van der Helm, M. W.; van der Meer, A. D.; Eijkel, J. C.; van den Berg, A.; Segerink, L. I. (2016b): Microfluidic organ-on-chip technology for blood-brain barrier research. In *Tissue barriers* 4 (1), e1142493. DOI: 10.1080/21688370.2016.1142493.
- van der Valk, J.; Brunner, D.; Smet, K. de; Fex Svenningsen, A.; Honegger, P.; Knudsen, L. E. et al. (2010): Optimization of chemically defined cell culture media - replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. In *Toxicology in vitro* (4), pp. 1053–1063. DOI: 10.1016/j.tiv.2010.03.016.
- van Itallie, C. M.; Fanning, A. S.; Bridges, A.; Anderson, J. M. (2009): ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton. In *Molecular biology of the cell* 20 (17), pp. 3930–3940. DOI: 10.1091/mbc.e09-04-0320.
- van Itallie, C. M.; Fanning, A. S.; Holmes, J.; Anderson, J. M. (2010): Occludin is required for cytokine-induced regulation of tight junction barriers. In *Journal of Cell Science* 123 (Pt 16), pp. 2844–2852. DOI: 10.1242/jcs.065581.

- van Kooten, T. G.; Schakenraad, J. M.; van der Mei, H. C.; Dekker, A.; Kirkpatrick, C. J.; Busscher, H. J. (1994): Fluid shear induced endothelial cell detachment from glass - influence of adhesion time and shear stress. In *Medical Engineering & Physics* 16 (6), pp. 506–512. DOI: 10.1016/1350-4533(94)90077-9.
- Vandenhoute, E.; Dehouck, L.; Boucau, M.-C.; Sevin, E.; Uzbekov, R.; Tardivel, M. et al. (2011): Modelling the neurovascular unit and the blood-brain barrier with the unique function of pericytes. In *CNR* 8 (4), pp. 258–269. DOI: 10.2174/156720211798121016.
- Verkman, A. S. (2002): Aquaporin water channels and endothelial cell function. In *Journal of anatomy* 200 (6), pp. 617–627. DOI: 10.1046/j.1469-7580.2002.00058.x.
- Veszeka, S.; Tóth, A.; Walter, F. R.; Tóth, A. E.; Gróf, I.; Mészáros, M. et al. (2018): Comparison of a rat primary cell-based blood-brain barrier model with epithelial and brain endothelial cell lines. Gene expression and drug transport. In *Frontiers in molecular neuroscience* 11, p. 166. DOI: 10.3389/fnmol.2018.00166.
- Vistica, D. T.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Monks, A.; Boyd, M. R. (1990): New carbon dioxide-independent basal growth medium for culture of diverse tumor and nontumor cells of human and nonhuman origin. In *Journal of the National Cancer Institute* 82 (12), pp. 1055–1061. DOI: 10.1093/jnci/82.12.1055.
- Vu, K.; Weksler, B.; Romero, I.; Couraud, P.-O.; Gelli, A. (2009): Immortalized human brain endothelial cell line HCMEC/D3 as a model of the blood-brain barrier facilitates in vitro studies of central nervous system infection by *Cryptococcus neoformans*. In *Eukaryotic cell* 8 (11), pp. 1803–1807. DOI: 10.1128/EC.00240-09.
- Wakabayashi, Y.; Chua, J.; Larkin, J. M.; Lippincott-Schwartz, J.; Arias, I. M. (2007): Four-dimensional imaging of filter-grown polarized epithelial cells. In *Histochemistry and Cell Biology* 127 (5), pp. 463–472. DOI: 10.1007/s00418-007-0274-x.
- Walter, F. R.; Valkai, S.; Kincses, A.; Petneházi, A.; Czeller, T.; Veszeka, S. et al. (2016): A versatile lab-on-a-chip tool for modeling biological barriers. In *Sensors and Actuators B: Chemical* 222, pp. 1209–1219. DOI: 10.1016/j.snb.2015.07.110.
- Wang, D.; Kranz-Eble, P.; Vivo, D. C. de (2000): Mutational analysis of GLUT1 (SLC2A1) in Glut-1 Deficiency Syndrome. In *Hum. Mutat.* 16 (3), pp. 224–231. DOI: 10.1002/1098-1004(200009)16:3<224::AID-HUMU5>3.0.CO;2-P.

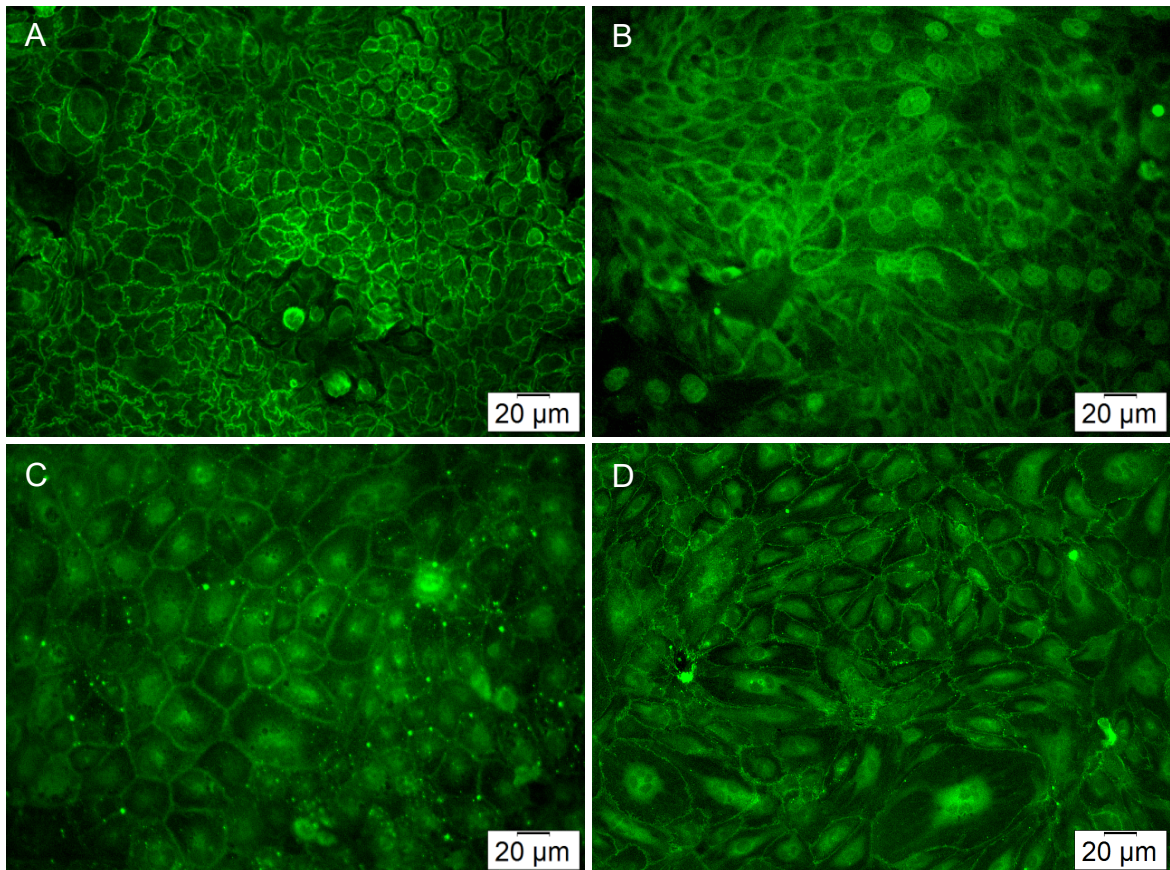
- Wang, Q.; Rager, J. D.; Weinstein, K.; Kardos, P. S.; Dobson, G. L.; Li, J.; Hidalgo, I. J. (2005): Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier. In *International Journal of Pharmaceutics* 288 (2), pp. 349–359. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2004.10.007.
- Wang, Y.; Xing, J.; Xu, Y.; Zhou, N.; Peng, J.; Xiong, Z. et al. (2015): In silico ADME/T modelling for rational drug design. In *Quarterly reviews of biophysics* 48 (4), pp. 488–515. DOI: 10.1017/S0033583515000190.
- Warren, M. S.; Zerangue, N.; Woodford, K.; Roberts, L. M.; Tate, E. H.; Feng, B. et al. (2009): Comparative gene expression profiles of ABC transporters in brain microvessel endothelial cells and brain in five species including human. In *Pharmacological Research* 59 (6), pp. 404–413. DOI: 10.1016/j.phrs.2009.02.007.
- Watanabe, T.; Dohgu, S.; Takata, F.; Nishioku, T.; Nakashima, A.; Futagami, K. et al. (2013): Paracellular barrier and tight junction protein expression in the immortalized brain endothelial cell lines bEND.3, bEND.5 and mouse brain endothelial cell 4. In *Biological & pharmaceutical bulletin* 36 (3), pp. 492–495. DOI: 10.1248/bpb.b12-00915.
- Watson, P. M. D.; Paterson, J. C.; Thom, G.; Ginman, U.; Lundquist, S.; Webster, C. I. (2013): Modelling the endothelial blood-CNS barriers. A method for the production of robust in vitro models of the rat blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier. In *BMC neuroscience* 14, p. 59. DOI: 10.1186/1471-2202-14-59.
- Weiss, N.; Miller, F.; Cazaubon, S.; Couraud, P.-O. (2009): The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. In *Biochimica et biophysica acta* 1788 (4), pp. 842–857. DOI: 10.1016/j.bbamem.2008.10.022.
- Weksler, B.; Romero, I. A.; Couraud, P.-O. (2013): The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. In *Fluids and barriers of the CNS* 10 (1), p. 16. DOI: 10.1186/2045-8118-10-16.
- Weksler, B. B.; Subileau, E. A.; Perrière, N.; Charneau, P.; Holloway, K.; Leveque, M. et al. (2005): Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. In *FASEB journal* 19 (13), pp. 1872–1874. DOI: 10.1096/fj.04-3458fje.
- Wevers, N. R.; Kasi, D. G.; Gray, T.; Wilschut, K. J.; Smith, B.; van Vught, R. et al. (2018): A perfused human blood-brain barrier on-a-chip for high-throughput assessment of barrier function and antibody transport. In *Fluids and barriers of the CNS* 15 (1), p. 23. DOI: 10.1186/s12987-018-0108-3.

- White, F. P.; Dutton, G. R.; Norenberg, M. D. (1981): Microvessels isolated from rat brain. Localization of astrocyte processes by immunohistochemical techniques. In *J Neurochem* 36 (1), pp. 328–332. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1981.tb02417.x.
- Wilhelm, I.; Farkas, A. E.; Nagyoszi, P.; Váró, G.; Bálint, Z.; Végh, G. A. et al. (2007): Regulation of cerebral endothelial cell morphology by extracellular calcium. In *Physics in medicine and biology* 52 (20), pp. 6261–6274. DOI: 10.1088/0031-9155/52/20/012.
- Wilhelm, I.; Krizbai, I. A. (2014): In Vitro Models of the Blood–Brain Barrier for the Study of Drug Delivery to the Brain. In *Mol. Pharmaceutics* 11 (7), pp. 1949–1963. DOI: 10.1021/mp500046f.
- Wilhelm, I.; Nyúl-Tóth, Á.; Suciú, M.; Hermenean, A.; Krizbai, I. A. (2016): Heterogeneity of the blood-brain barrier. In *Tissue barriers* 4 (1), e1143544. DOI: 10.1080/21688370.2016.1143544.
- Winkler, E. A.; Bell, R. D.; Zlokovic, B. V. (2011): Central nervous system pericytes in health and disease. In *Nature neuroscience* 14 (11), pp. 1398–1405. DOI: 10.1038/nn.2946.
- Wolburg, H.; Liebner, S.; Lippoldt, A. (2003): Freeze-fracture studies of cerebral endothelial tight junctions. In *Methods in molecular medicine* 89, pp. 51–66. DOI: 10.1385/1-59259-419-0:51.
- Wong, K. H. K.; Truslow, J. G.; Tien, J. (2010): The role of cyclic AMP in normalizing the function of engineered human blood microvessels in microfluidic collagen gels. In *Biomaterials* 31 (17), pp. 4706–4714. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.02.041.
- Wu, Z.; Hofman, F. M.; Zlokovic, B. V. (2003): A simple method for isolation and characterization of mouse brain microvascular endothelial cells. In *Journal of Neuroscience Methods* 130 (1), pp. 53–63. DOI: 10.1016/S0165-0270(03)00206-1.
- Wuest, D. M.; Wing, A. M.; Lee, K. H. (2013): Membrane configuration optimization for a murine in vitro blood-brain barrier model. In *Journal of Neuroscience Methods* 212 (2), pp. 211–221. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2012.10.016.
- Ye, D.; Dawson, K. A.; Lynch, I. (2015): A TEM protocol for quality assurance of in vitro cellular barrier models and its application to the assessment of nanoparticle transport mechanisms across barriers. In *The Analyst* 140 (1), pp. 83–97. DOI: 10.1039/c4an01276c.
- Ye, M.; Sanchez, H. M.; Hultz, M.; Yang, Z.; Bogorad, M.; Wong, A. D.; Searson, P. C. (2014): Brain microvascular endothelial cells resist elongation due to curvature and shear stress. In *Scientific reports* 4, p. 4681. DOI: 10.1038/srep04681.

- Young, E. W. K.; Simmons, C. A. (2010): Macro- and microscale fluid flow systems for endothelial cell biology. In *Lab Chip* 10 (2), pp. 143–160. DOI: 10.1039/b913390a.
- Yousif, L. F.; Di Russo, J.; Sorokin, L. (2013): Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes. In *Cell adhesion & migration* 7 (1), pp. 101–110. DOI: 10.4161/cam.22680.
- Yu, J.; Vodyanik, M. A.; Smuga-Otto, K.; Antosiewicz-Bourget, J.; Frane, J. L.; Tian, S. et al. (2007): Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. In *Science* 318 (5858), pp. 1917–1920. DOI: 10.1126/science.1151526.
- Zenker, D.; Begley, D.; Bratzke, H.; Rubsamen-Waigmann, H.; Briesen, H. (2003): Human blood-derived macrophages enhance barrier function of cultured primary bovine and human brain capillary endothelial cells. In *The Journal of Physiology* 551 (3), pp. 1023–1032. DOI: 10.1111/j.1469-7793.2003.01023.x.
- Zheng, W.; Wang, Z.; Zhang, W.; Jiang, X. (2010): A simple PDMS-based microfluidic channel design that removes bubbles for long-term on-chip culture of mammalian cells. In *Lab Chip* 10 (21), pp. 2906–2910. DOI: 10.1039/c005274d.
- Zigler, J. S.; Lepe-Zuniga, J. L.; Vistica, B.; Gery, I. (1985): Analysis of the cytotoxic effects of light-exposed HEPES-containing culture medium. In *In vitro cellular & developmental biology* 21 (5), pp. 282–287. DOI: 10.1007/bf02620943.
- Zihni, C.; Mills, C.; Matter, K.; Balda, M. S. (2016): Tight junctions. From simple barriers to multifunctional molecular gates. In *Nature reviews. Molecular cell biology* 17 (9), pp. 564–580. DOI: 10.1038/nrm.2016.80.
- Zougbedé, S.; Miller, F.; Ravassard, P.; Rebollo, A.; Cicéron, L.; Couraud, P.-O. et al. (2011): Metabolic acidosis induced by Plasmodium falciparum intraerythrocytic stages alters blood-brain barrier integrity. In *Journal of cerebral blood flow and metabolism* 31 (2), pp. 514–526. DOI: 10.1038/jcbfm.2010.121.

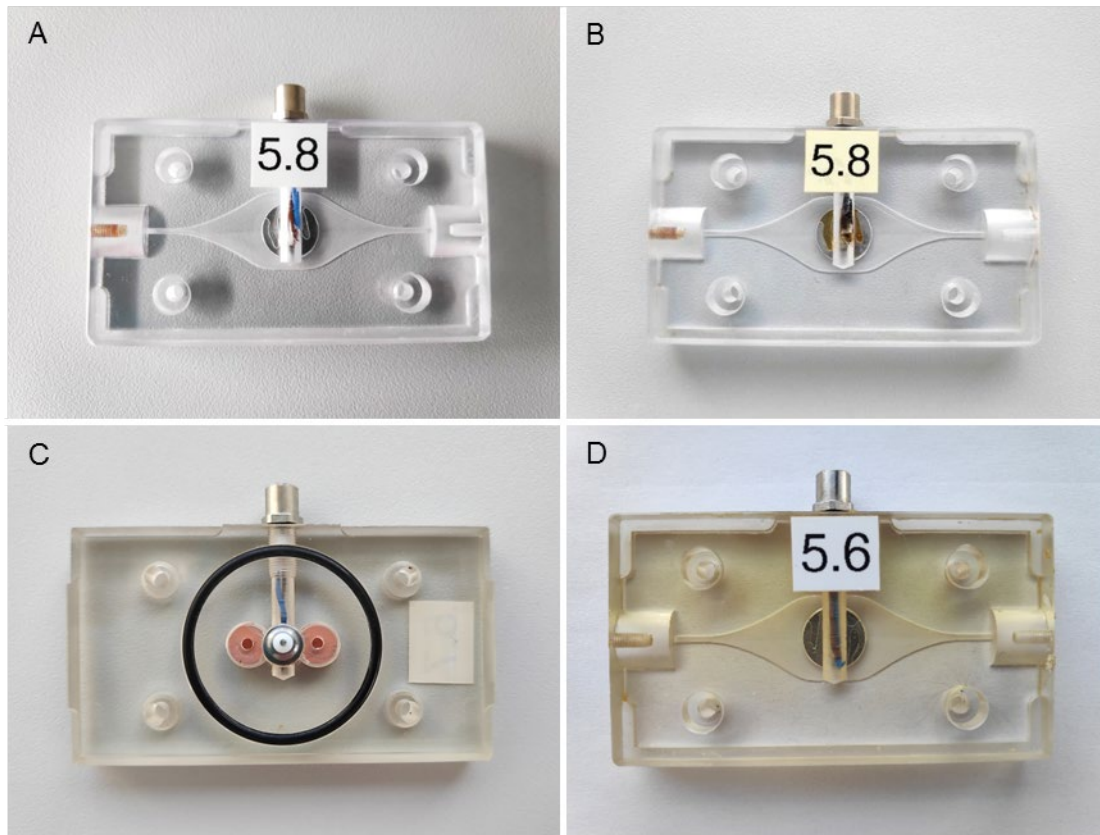
9 Anhang

Immunfluoreszenzfärbungen der Positivkontrollen

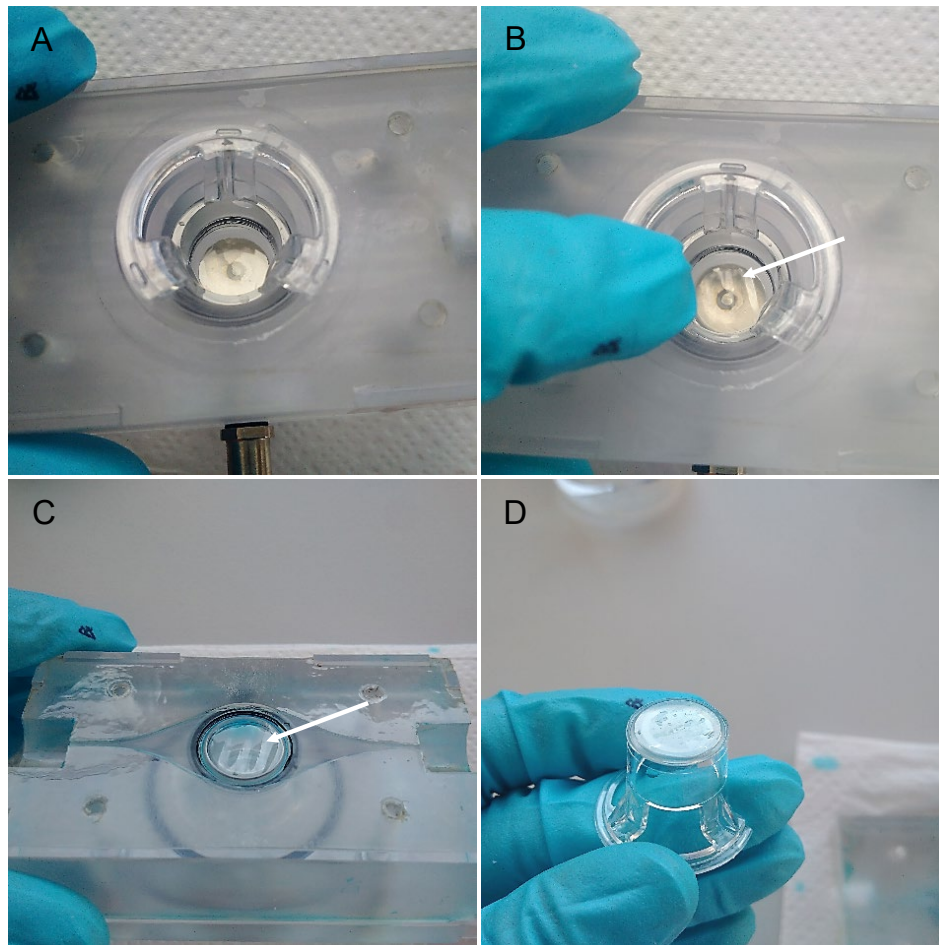


Anhang 9.1: Mikroskopische Aufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen der Zellen Caco-2, HCE-T und PBEC mit dem jeweiligen FITC-konjugierten Sekundärantikörper (grün): Caco-2, ZO-1 (A); HCE-T, Occludin (B); HCE-T, VE-Cadherin (C); PBEC, Claudin-5, mit freundlicher Überlassung von Verena Ledwig (Dissertation in Arbeit) (D)

DynaMiTES nach verschiedenen Sterilisationsmethoden

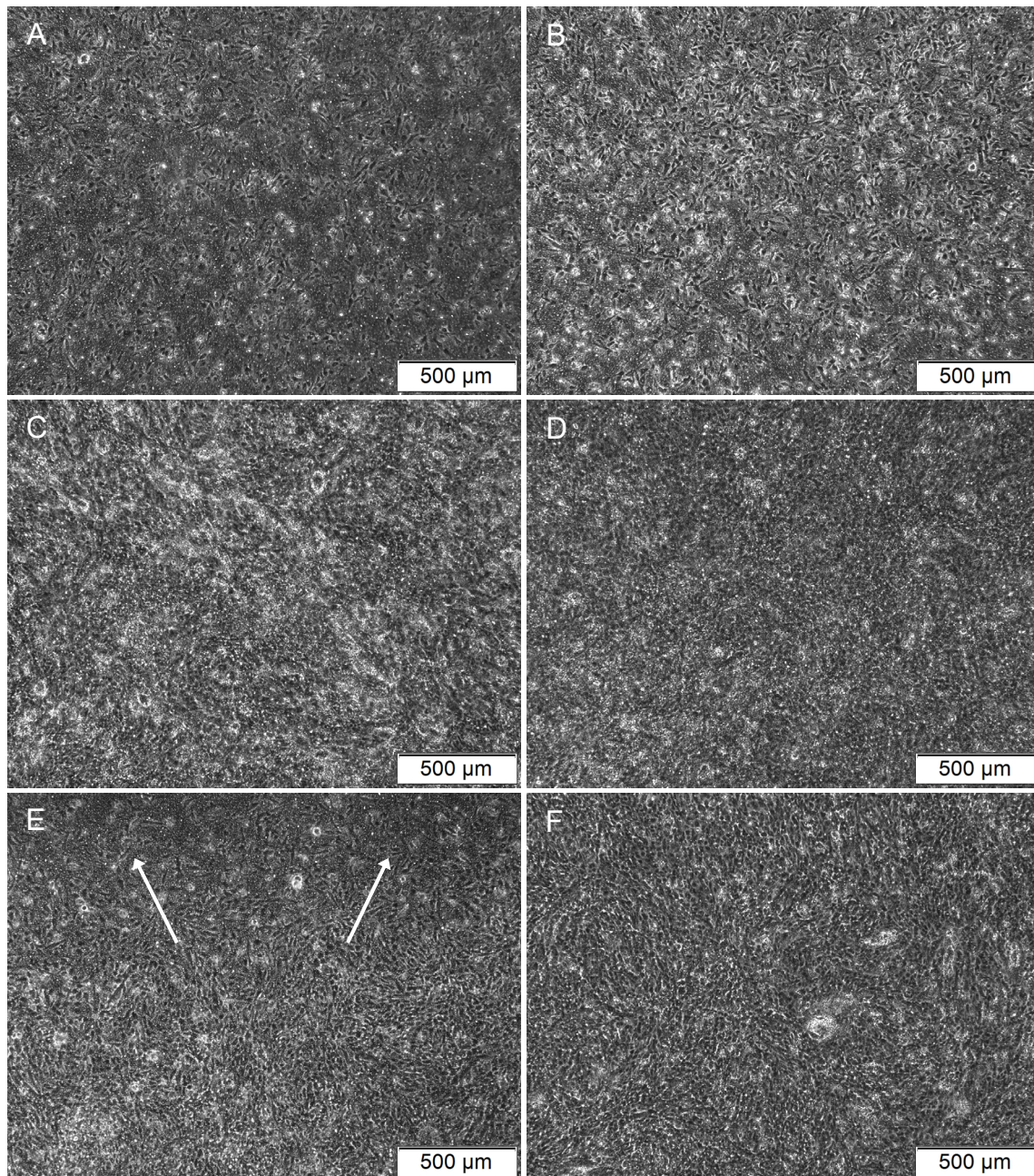


Anhang 9.2: DynaMiTES-Ebenen vor bzw. nach verschiedenen Sterilisationsmethoden; untere Ebene vor der Sterilisation (A), untere Ebene nach einer Sterilisation mit trockener Hitze (B), obere Ebene mit leichter Gelbfärbung nach der Gamma-Strahlensterilisation (C) und die untere Ebene nach der Beta-Strahlensterilisation mit Gelbfärbung (graduellen Verlauf)

Einsetzprozess des DynaMiTES

Anhang 9.3: Einsetzprozess eines unbesiedelten Zellkultureinsatzes; halb eingesetzter Zellkultureinsatz ohne Wellenbildung (A), vollständig eingesetzter Zellkultureinsatz mit leichter Wellenbildung der Membran (Pfeil, B + C), unveränderter Zellkultureinsatz nach dem Herausnehmen (D)

Kultivierung im DynaMiTES ab der Einsaat



Anhang 9.4: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von hCMEC/D2 Zellen auf Transwell™ Zellkultureinsätze 6 h nach der Einsaat kurz vor dem Einsetzen ins DynaMiTES bzw. in die 12-Well-Zellkulturplatte (A, B) sowie 7 Tage nach einer statischen Kultivierung in der 12-Well-Zellkulturplatte (C, D) bzw. im DynaMiTES (E, F); die Pfeile markieren lichte Stellen im Monolayer an Tag 7.